

Charakterisierung der Kernexportsequenz des  
Hitzestresstranskriptionsfaktors A2 aus  
*Lycopersicon peruvianum*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Dirk Heerklotz  
Wiesbaden

Frankfurt am Main, Juli 2001



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1	Stress ist ein elementarer Bestandteil des Lebens.....	7
1.2	Die Hsp20 ( $\alpha$ -Kristallin)-Familie .....	9
1.3	Eine gestörte Proteinhomöostase führt höchstwahrscheinlich zur Aktivierung von Hitzestresstranskriptionsfaktoren .....	11
1.4	Hsf besitzen eine klar definierte modulare Architektur .....	12
1.5	In eukaryontischen Zellen müssen pro Minute über eine Millionen Protein- und RNA-Moleküle aktiv über die Kernmembran transportiert werden.....	15
1.6	Import- und Exportsequenzen.....	17
1.7	Import- und Exportrezeptoren .....	18
1.8	Die Funktion der kleinen GTPase Ran beim Transport .....	20
1.9	Fragestellungen und Ziele der Arbeit .....	21
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Klonierungen allgemein .....	24
2.2	Vermehrung von DNA für die Expression in pflanzlichen und tierischen Zellen .....	25
2.3	Expressionsplasmide.....	25
2.3.1	Plasmide zur Expression in pflanzlichen Zellen .....	26
2.3.2	Plasmide zur Expression in Säugerzellen .....	27
2.4	Zellkultur.....	29
2.4.1	Tomatensuspensionszellkultur von <i>Lycopersicon peruvianum</i> .....	29
2.4.2	CHO-K1 Zellen .....	29
2.5	Isolierung und Aufarbeitung von Tabakmesophyllprotoplasten.....	29
2.6	Transfektion von Tabakmesophyllprotoplasten.....	30
2.7	Transfektion von CHO-K1 Zellen.....	31
2.8	Antiseren .....	31
2.9	Lichtmikroskopischer Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenz..	33
2.9.1	Indirekte Immunfluoreszenz an Tabakmesophyllprotoplasten .....	33
2.9.2	Indirekte Immunfluoreszenz an CHO-K1 Zellen .....	34
2.9.3	Mikroskopische Analyse und digitale Bildverarbeitung .....	34

<b>2.10 Proteinextraktion und SDS-Gelelektrophorese .....</b>	<b>35</b>
2.10.1 Zellernte und Präparation von Proteinextrakten aus CHO-K1 Zellen ....	35
2.10.2 Zellernte und Präparation von Proteinextrakten aus Tabakmesophyllprotoplasten.....	35
2.10.3 PAA-Gelelektrophorese und Western-Analyse .....	36
<b>2.11 Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>36</b>
2.11.1 Fixierung und Einbettung von Tomatenzellen aus Suspensionskultur für Ultrastrukturanalysen.....	36
2.11.2 Fixierung und Einbettung von Tomatenzellen für Immunogoldmarkierungen .....	37
2.11.3 Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie .....	38
2.11.4 Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten.....	39
<b>2.12 Messung der Luciferaseaktivität in CHO-K1 Zellen.....</b>	<b>39</b>
<b>2.13 Hitzestressversuche .....</b>	<b>40</b>
 <b>3 Ergebnisse.....</b>	 <b>41</b>
<b>3.1 Pflanzliche und tierische Zellsysteme zur transienten, heterologen         Proteinexpression .....</b>	 <b>41</b>
3.1.1 CHO-K1 Zellen als Modellsystem für die Untersuchung von Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus <i>L. peruvianum</i> .....	42
3.1.2 Identifikation einer Kernexportsequenz in HsfA2 .....	43
3.1.3 Wichtige Strukturmerkmale für den Import und Export von HsfA2.....	44
3.1.4 Die Fusion der Kernexportsequenz von HsfA2 an HsfB1 führt zum Export des Fusionsproteins .....	47
3.1.5 Leptomycin B inhibiert den Kernexport von HsfA2 auch in Tabakmesophyllprotoplasten.....	48
3.1.6 Hitzestress führt in CHO-K1 Zellen zur zytoplasmatischen Retention von HsfA2 .....	50
3.1.7 Die hitzestressbedingte Retention von HsfA2 im Zytoplasma ist reversibel .....	53
3.1.8 Für die Translokation von HsfA2 in den Zellkern sind keine intakten Mikrotubuli erforderlich .....	54
3.1.9 Luciferasereporterassays in CHO-K1 Zellen .....	56
3.1.10 Wahl eines geeigneten Promotors .....	56
3.1.11 Das Transaktivierungspotential von HsfA2 ist stark von dessen Lokalisation abhängig .....	58
3.1.12 HsfB1 kann in CHO-K1 Zellen nicht durch Kotransfektion mit HsfA1 synergistisch transaktiviert werden.....	59



3.1.13 Ein autofluoreszenter „Tag“ beeinflusst die Transkriptionsaktivität von HsfA2 .....	61
<b>3.2 Interaktion von HsfA2 mit niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17-Familie .....</b>	<b>64</b>
3.2.1 HSG-Komplexe in Tomatenzellen .....	64
3.2.2 Expression von lmw-Hsp und HsfA2 in CHO-K1 Zellen.....	65
3.2.3 Die fadenförmigen Strukturen des Tomaten-Hsp17(II) koloalisieren nicht mit Bestandteilen des Zytoskeletts .....	68
3.2.4 Die Strukturbindung von HsfA2 führt zu einer stark reduzierten Transkriptionsaktivität .....	70
3.2.5 Lp-Hsp17(II) bildet in Tabakprotoplasten zusammen mit HsfA2 grosse zytoplasmatische Aggregate .....	71
3.2.6 Die Koexpression von HsfA2M4 und Lp-Hsp17(II) führt nicht zur Bildung grosser, zytoplasmatischer Komplexe.....	73
3.2.7 Die Koexpression von GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(I) führt nicht zur Aggregatbildung in Tabakprotoplasten.....	74
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Modellsysteme für die funktionelle Untersuchung von Hsf aus Tomate.....</b>	<b>76</b>
4.1.1 Expression von Tomaten-Hsf in CHO-K1 Zellen.....	77
<b>4.2 Identifikation der Kernexportsequenz von HsfA2 .....</b>	<b>77</b>
4.2.1 Das bisherige Modell bedarf einiger Modifikationen.....	78
4.2.2 NES-vermittelter Kernexport von HsfA2 .....	79
4.2.3 Kernexportsignale besitzen einen geringen Konservierungsgrad.....	80
4.2.4 Strukturmerkmale von HsfA2 für den Import und die Interaktion mit HsfA1 .....	81
4.2.5 Die Transkriptionsaktivität von HsfA2 wird stark durch seine Lokalisation beeinflusst.....	82
4.2.6 Regulation der Transkription durch Lokalisation, drei Beispiele .....	84
4.2.7 Für die Translokation von HsfA2 sind keine intakten Mikrotubuli erforderlich .....	87
4.2.8 Hitzestress führt zur reversiblen zytoplasmatischen Lokalisation von HsfA2 .....	88
<b>4.3 Expression von pflanzlichen lmw-Hsp in CHO-K1 Zellen .....</b>	<b>89</b>
4.3.1 HSG-Komplexe als Speicherort für untranslatierte poly(A) <sup>+</sup> -RNA.....	90
4.3.2 HSG binden partiell entfaltete Proteine .....	91
<b>4.4 Offen gebliebene Fragen und weiterführende Arbeiten .....</b>	<b>93</b>

<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>
6.1	Primer- und Templatbindungssequenzen.....	117
6.2	Plasmidkarten .....	119
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AD .....	Aktivatorodomäne
AK .....	Arbeitskreis
Amp .....	Ampicilin
AS .....	Aminosäure
ATP .....	Adenosintriphosphat
BSA .....	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BSA-C .....	acetyliertes Rinderserumalbumin
cAMP .....	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA .....	komplementäre-DNA
CHO-Zellen .....	Chinesische Hamster Ovary Zellen
C-Terminus .....	Carboxy-Terminus
CWF-Gelatine .....	Cold Water Fish Skin Gelatine
cy .....	Zytoplasma
CCLR .....	Cell Culture Lysis Reagent
CFP .....	Cyan fluoreszierendes Protein
Cy2 .....	Carbozyanin
Cy3 .....	Indocarbocyanin
CaMV .....	Cauliflower Mosaic Virus
CMV .....	Cyto Megalo Virus
DABCO .....	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
DAPI .....	Diamidino-2-phenylindol
DBD .....	DNA-Bindungsdomäne
DBP .....	Dibenzoylperoxid
Dm. ....	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure
Ds .....	<i>Dyscosoma species</i>
DTT .....	Dithiothreitol
EDTA .....	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA .....	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM .....	Elektronenmikroskopie
er .....	Endoplasmatisches Retikulum
FITC .....	Fluorescein
g .....	relative Erdbeschleunigung
GA .....	Glutardialdehyd
GFP .....	Grün fluoreszierendes Protein
Gm. ....	<i>Glycine max</i>
GUS .....	Glucuronidase
h .....	Stunde
hnRNP .....	heterogenes nukleäres RNP
HRP .....	Horse-Raddish-Peroxidase
Hsc .....	Hitze stresskonstitutives (-Protein)
HSE .....	Hitze stress element
Hsf .....	Hitze stress transkriptionsfaktor
HSG .....	Hitze stress granula
Hsp .....	Hitze stress protein
HTH .....	Helix-Turn-Helix (-Motiv)
HR .....	Hydrophobic Repeat
IEM .....	Immunoelektronenmikroskopie
IMF .....	Immunfluoreszenz
Kan .....	Kanamycin
Ko .....	Kontrolle
KDa .....	kilo-Dalton
LMB .....	Leptomycin B

lmw	low molecular weight
Lp	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
luc	Luciferase
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration: mol/l)
mc	monoklonal
MCS	Multiple Cloning Site
MDa	mega Dalton
Merge	Überlagerung
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
mt	Mitochondrien
MtsB	Mikrotubuli-stabilisierender Puffer
NES	Nuclear Export Sequence (Signal)
NLS	Nuclear Localisation Sequence (Signal)
NPC	Nuclear Pore Complex
N-Terminus	Amino-Terminus
Nups	Nukleoporeine
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc	polyklonal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PhCo	Phasenkontrast
PIPES	Piperazin-N,N-bis-(2-Ethansulfonsäure)
Ps	<i>Pisum sativum</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RLU	relative light units
RNP	Ribo-Nukleo-Protein-Partikel
RT	Raumtemperatur
SG	Stressgranula
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sek	Sekunde
SDS	Sodium-(Natrium)dodecylsulfat
snRNP	small nuclear RNP
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Methylamin
t-RNA	transfer-RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute
v	Vakuole
WB	Western-Blot

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Stress ist ein elementarer Bestandteil des Lebens

Die Umwelt stellt hohe Anforderungen an die Adaptationsfähigkeit der Lebewesen. Neben Wasser- und Nahrungsmangel können sowohl hohe Salz- und Schadstoffkonzentrationen als auch Strahlung auf die Organismen einwirken. Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor, der auch im Mittelpunkt der weiteren Betrachtungen stehen soll, ist die Temperatur. So existiert für jeden Organismus ein normothermer Temperaturbereich. Wechselnde Umwelteinflüsse können jedoch zu einer Veränderung der Temperatur über einen tolerierbaren Bereich hinaus führen. Hierdurch wird die Synthese einer bestimmten Klasse von „Schutzproteinen“ induziert, die als Hitzestressproteine (Hsp) bezeichnet werden. Diese verhindern die Aggregation von denaturierten, partiell ungefalteten Proteinen und halten diese in einem faltungsaktiven Zustand (Übersicht in Nover et al., 1991).

Historisch gesehen begann die Erforschung der Hitzestressantwort auf Transkriptionsebene 1962 mit der Beobachtung des italienischen Entwicklungsbiologen Ferruccio Ritossa, dass Hitzestress bei Polytänchromosomen der Speicheldrüse von *Drosophilalarven* zu einem veränderten „Puffmuster“ führt, was Zeichen aktiver Genexpression ist (Ritossa, 1962). Diese durch eine „unbeabsichtigte“ Temperaturerhöhung in einem Inkubator gemachte Entdeckung kann als Meilenstein in der Erforschung der Stressantwort bezeichnet werden, da sich die meisten Hsp auch durch andere Stressoren wie beispielsweise:

- Schwermetalle ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ )
- stark oxidierende Substanzen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Paraquat)
- Hemmstoffe der Proteinbiosynthese (2,4-DNP, Azid)
- Aminosäureanaloga (AzC)

induzieren lassen (Scharf et al., 1998b). Die Induktion von Hitzestressproteinen wird deshalb generell auch als Stressantwort bezeichnet.

Erst über 10 Jahre später konnten die stressinduzierten Proteine als Hsp identifiziert (Tissieres et al., 1974) und die dazugehörigen mRNAs charakterisiert werden (McKenzie und Meselson, 1977). Die Temperaturschwelle, die

eine Induktion der Hitzestressantwort und die Expression von Hsp bewirkt, ist für jeden Organismus unterschiedlich und stark dem natürlichen Lebensraum angepasst (Nover, 1990; Feder und Hofmann, 1999).

*Hitzestressproteine sind hochkonserviert und werden in Multiproteinfamilien unterteilt*

Es verwundert deshalb auch nicht, dass die Hsp kodierenden Gene hoch konserviert sind (Schlesinger, 1990) und bisher in jeder Spezies nachgewiesen werden konnten (Feder und Hofmann, 1999). Selbst die kleinsten bekannten Genome besitzen Gene, die Hsp kodieren, wie Untersuchungen an Mykoplasmen (Dascher et al., 1990) gezeigt haben. Die meisten dieser Gene und ihre Produkte lassen sich in Familien einteilen, wobei die Einordnung zum einen durch das Molekulargewicht aber auch über Sequenzhomologien vorgenommen wird (Gething, 1997). Unterschieden werden 5 grosse Familien: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20, wobei es bei den meisten Eukaryonten immer mehrere Mitglieder (Isoformen) in den einzelnen Familien gibt. Diese unterscheiden sich im allgemeinen durch ihre intrazelluläre Lokalisation, Funktion und Expressionsmuster. Neben den stressinduzierten Hsp koexistieren die konstitutiv exprimierten Stressproteine, die im allgemeinen als Hsc (engl. constitutive oder cognate; konstitutive) bezeichnet werden (Nover, 1991; Schöffl et al., 1998).

*Die Funktion der Hsp beschränkt sich nicht nur auf die Stressantwort*

Die meisten Hsp gehören zur Gruppe der molekularen Chaperone (Craig et al., 1994). Diese Bezeichnung wurde ursprünglich von Laskey et al. (1978) verwendet, um die Rolle von Nukleoplasmin bei der Assemblierung von Nukleosomen zu beschreiben. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Proteine aus der Gruppe der Chaperone neben der Proteinfaltung und Topogenese auch an der Proteintranslokation in die Mitochondrien, Chloroplasten und der Regulation der Transkription beteiligt sind.

Da im zweiten Teil der Arbeit die Interaktion niedermolekularer Stressproteine mit Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf) im Vordergrund steht, soll nur die Hsp20-Familie im nachfolgenden Abschnitt ausführlicher eingeführt werden. Gute Übersichten zu den anderen Hsp-Familien finden sich in Nover (1991) und Nover und Scharf (1997).

## 1.2 Die Hsp20 ( $\alpha$ -Kristallin)-Familie

*$\alpha$ -Kristallin ist das Hauptstrukturprotein der Augenlinse von Vertebraten*

Unter dem Sammelbegriff kleine bzw. Imw-Hitzestressproteine (engl. low molecular weight; niedermolekulare) werden Proteine mit einem Monomergewicht von 9-42 kDa zusammengefasst (Ehrnsperger et al., 1999). Vertreter dieser Familie konnten in bisher allen untersuchten Organismen nachgewiesen werden und gehören überwiegend zur Gruppe der molekularen Chaperone.

Das wohl bekannteste Mitglied dieser Hsp-Familie ist  $\alpha$ -Kristallin, das als Hauptstrukturprotein in der Augenlinse aller Vertebraten vorkommt. Es setzt sich aus den beiden Polypeptiden  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Kristallin zusammen, die eine 57-prozentige Sequenzhomologie besitzen, und in der Linse in einem molaren Verhältnis von 3:1 nachweisbar sind (Groenen et al., 1994). Während  $\alpha$ B-Kristallin auch in zahlreichen anderen Geweben nachweisbar ist und dort wie andere Chaperone die ungewollte Aggregation von Proteinen verhindert (Merck et al., 1993; Rao et al., 1998), kommt  $\alpha$ A-Kristallin fast ausschliesslich in der Augenlinse vor, wo es zusammen mit  $\alpha$ B-Kristallin die Eintrübung des Linsenkörpers verhindert (Graw, 1997).

Interessant ist ferner, dass zahlreiche Krankheiten wie Multiple Sklerose (van Noort, 1996; Aquino et al., 1997), Alzheimer (Renkawek et al., 1994) und die Creutzfeld Jakob Krankheit (Renkawek et al., 1992) mit einer erhöhten Expression von  $\alpha$ B-Kristallin assoziiert sind.

*Die  $\alpha$ -Kristallin-Domäne ist zentraler Bestandteil aller Imw-Hsp*

Der Konservierungsgrad innerhalb der Hsp20-Familie ist nicht besonders hoch. Die Zusammenfassung in eine Familie erfolgt deshalb aufgrund von Sequenzhomologien in der C-terminalen Hälfte der Proteine und kurzen, konservierten, phenylalaninreichen Abschnitten am N-Terminus (Ehrnsperger et al., 1997a). Zentraler Bestandteil aller Familienmitglieder ist die etwa 90-100 Aminosäure (AS) grosse, C-terminale,  $\alpha$ -Kristallindomäne (Kirschner et al., 2000; MacRae, 2000), deren unterschiedliche N- bzw. C-terminale Verlängerung zu den Variationen im Molekulargewicht der einzelnen Imw-Hsp führt (Nover et al., 1991; Caspers et al., 1995; Waters et al., 1996).

*Lmw-Hsp bilden hochmolekulare Komplexe variabler Grösse*

Trotz grosser Variationen im Molekulargewicht und geringer Sequenzhomologie besitzen alle Mitglieder der Hsp20-Familie die Fähigkeit, Oligomere variabler Grösse (140-800 kDa) zu bilden (Forreiter und Nover, 1998; Haley et al., 2000). Für ihre Funktion als molekulare Chaperone ist die Oligomerisierung essentiell (Haley et al., 1998). Mittels elektronenmikroskopischer Techniken konnte gezeigt werden, dass Oligomere aus lmw-Hsp bzw.  $\alpha$ -Kristallin globuläre Strukturen mit einem Durchmesser von 10-25 nm bilden (Ehrnsperger et al., 1997b). Auch in pflanzlichen Geweben führt ein anhaltender Hitzestress zur Bildung hochmolekularer, strukturierter Chaperonkomplexe im Zytoplasma. Diese als Hitzestressgranula (HSG) bezeichneten, etwa 40 nm grossen Komplexe (siehe auch 3.13), konnten in bisher allen untersuchten Pflanzenspezies nachgewiesen werden (Nover et al., 1989). Sie bestehen überwiegend aus Hsp17 (Scharf et al., 1998a) und Hsp70 (Neumann et al., 1987), weiter konnte bei Tomatenzellen der Hitzestresstranskriptionsfaktor A2 (Scharf et al., 1998a) darin nachgewiesen werden.

Kirschner et al. postulieren, dass diese hochmolekularen Komplexe aus lmw-Hsp eine Matrix zum Schutz für ungefaltete Proteine unter Hitzestress darstellen (Kimpel und Key, 1985; Kirschner et al., 2000). Weiter wird eine „Speicherfunktion“ der HSG für Haushalts-mRNA diskutiert (Nover et al., 1983; Nover et al. 1989).

*Die meisten pflanzlichen lmw-Hsp werden erst unter Stress synthetisiert*

Die Anzahl der lmw-Hsp kodierenden Gene variiert sehr stark von Spezies zu Spezies, wobei die Vielfalt vermutlich auf Genduplikationen und nachfolgende Modifikationen während der Evolution zurückgeht (de Jong et al., 1998). Auffällig ist, dass Pflanzen ungewöhnlich viele hitzestressinduzierbare Vertreter der Hsp20-Familie besitzen (Kirschner et al., 2000). Bis auf wenige Ausnahmen z.B. während der Pollenentwicklung (Nover und Scharf, 1997), sind alle lmw-Hsp erst unter Stressbedingungen nachweisbar. Im Gegensatz hierzu werden bei Vertebraten zahlreiche lmw-Hsp auch unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert. Stresssituationen führen allerdings auch hier zu einer um das 10-20-fach gesteigerten Expressionsrate (Arrigo und Landry, 1994; Waters et al., 1996).



### *Bei Pflanzen gibt es 5 verschiedene lmw-Hsp Familien*

Im Vergleich zu anderen Organismengruppen kommen in Pflanzen sehr viele verschiedene Vertreter der Hsp20-Familie vor. Die pflanzlichen lmw-Hsp werden deshalb in 5 Klassen (I-V) eingeteilt (Waters et al., 1996; Waters und Vierling, 1999; Scharf et al., 2001), wobei die organellspezifische Lokalisation die Basis für die Einteilung bildet. Vertreter der Klassen I und II sind zytoplasmatisch lokalisiert, Klasse III Proteine befinden sich in den Plastiden, Klasse IV Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER), und Mitglieder der Klasse V kommen in den Mitochondrien vor.

Der Grund für die Koexistenz von zwei Klassen im Zytoplasma ist bisher unbekannt. Ebenso unklar ist der Grund für die hohe Diversität niedermolekularer Hsp in Pflanzen. Waters et al. (1996) diskutieren jedoch als möglichen Grund die Anpassung an zahlreiche Lebensräume und somit unterschiedliche Stressbedingungen, da Pflanzen ortsgebundene Lebewesen sind.

### **1.3 Eine gestörte Proteinhomöostase führt höchstwahrscheinlich zur Aktivierung von Hitzestresstranskriptionsfaktoren**

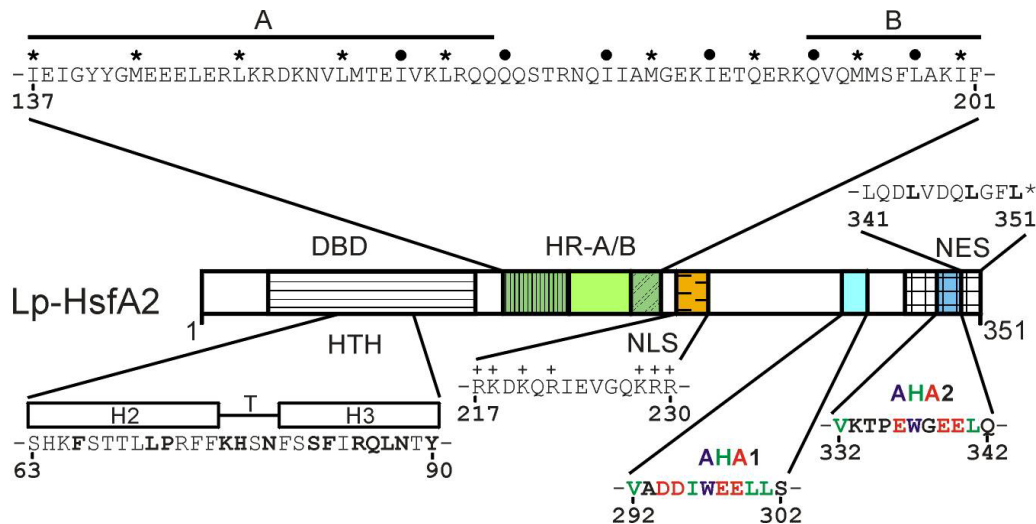
Hitzestresstranskriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Stressantwort. Sie sind das letzte Glied in der Signaltransduktionskette, die zur Expression von Hitzestressproteinen als Antwort auf physiologischen Stress führt (Nover et al., 1991, 1996; Morimoto, 1998; Zhong et al., 1998). Hierbei sind die Oligomerisierung zu sogenannten Homotrimeren, deren Import in den Zellkern und die hochaffine Bindung an Hitzestresselemente (HSE) im Promotorbereich der Zielgene essentielle Bestandteile des Aktivierungsprozesses. Für eine effiziente Bindung an die stromaufwärts der TATA-Box liegenden Strukturelemente werden mindestens drei HSE mit der Konsensussequenz 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3' benötigt (Schöffl et al., 1998).

Der Mechanismus, bzw. die Signale, welche die Hsf-Trimerisierung und die Bindung an die DNA regulieren sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Allerdings gibt es experimentelle Hinweise, dass die stressbedingte Anreicherung und Aggregation denaturierter Proteine zur Störung der intrazellulären Proteinhomöostase und zur Hsf-Aktivierung führt

(Scharf et al., 1998b). So führt beispielsweise (i) die Injektion von denaturierten Proteinen in *Xenopus* Oozyten (Ananthan et al., 1986; Mifflin und Cohen, 1994) und (ii) die Expression von abnormal gefalteten Proteinen (Hiromi und Hotta, 1985; Grant et al., 1989) zur Hsf-Aktivierung. Sehr gut in dieses Modell passen Beobachtungen, dass Hsf unter Hitzestress nicht mehr durch eine Interaktion mit molekularen Chaperonen wie Hsc70 inhibiert werden und es so zum Verlust der Feedback-Hemmung kommt (Mosser et al., 1993; Shi et al., 1998). Weiter werden eine Aktivierung durch Serinphosphorylierung (Kline und Morimoto, 1997) und direkte Effekte der Temperaturerhöhung auf die Hsf-Konformation diskutiert (Zimarino et al., 1990; Farkas et al., 1998). Zhong et al. (1998) konnten mit in vitro durchgeführten Versuchen zeigen, dass der *Drosophila* (Dm)-Hsf durch Hitzestress reversibel von einer monomeren (inaktiven, nicht DNA-bindenden) in eine trimere (aktive, DNA-bindende) Form überführt werden kann. Hierbei stellte sich heraus, dass die Konformationsänderung in die aktive, trimere Form nur durch Hitze- und oxidativen Stress, nicht jedoch durch chemische Stressoren wie Salicylat, Dinitrophenol, Arsen und Ethanol induziert werden konnte.

#### **1.4 Hsf besitzen eine klar definierte modulare Architektur**

Ein universelles Kennzeichen aller Hsf ist eine klar definierte, modulare Architektur (Scharf et al., 1994; Wu, 1995; Nover et al., 1996; Nover et al., 2001). So besitzen alle bisher bekannten Hsf eine N-terminale DNA Bindungsdomäne (DBD), eine zentrale Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B) und eine C-terminale Aktivierungsdomäne (AD), welche nachfolgend kurz vorgestellt und beschrieben werden.



**Abbildung 1: Strukturelemente eines Hitzestresstranskriptionsfaktors am Beispiel von HsfA2 aus *L.peruvianum*.**

DBD, DNA-Bindungsdomäne; HTH, Helix-Turn-Helix; HR, Hydrophobic repeats (HR-A/B-Region, Oligomerisierungsdomäne); NES, Nuclear export sequence (Kernexportsequenz); NLS, Nuclear localisation sequence (Kernimportsequenz).

#### ➤ **DNA Bindungs Domäne (DBD)**

Die am höchsten konservierte N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD; Scharf et al., 1998a) besteht aus einem Bündel von 3  $\alpha$ -helikalen Strukturen (H1-H3) und 4 antiparalell zueinander angeordneten  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1- $\beta$ 4). Die spezifische Erkennung und Bindung an die Hitzestresselemente im Promotor erfolgt über das zentrale Helix-Turn-Helix Motiv (H2-T-H3; Damberger et al., 1994; Harrison et al., 1994; Vuister et al., 1994; Schultheiss et al., 1996). Eine Besonderheit der pflanzlichen Hsf ist die Deletion von 11 AS zwischen den Faltblättern  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4. Im Gegensatz zu allen nicht-pflanzlichen Hsf, die hier einen 15 Aminosäure langen, unstrukturierten Loop besitzen, sind die Faltblätter  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 bei pflanzlichen Hsf nur durch einen 4 AS langen „Linker“ miteinander verbunden.

#### ➤ **Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region)**

Verbunden über einen „Linker“ (L1) variabler Länge von 15-80 AS (Flick et al., 1994), grenzt die Oligomerisierungsdomäne (Sorger und Nelson, 1989; Peteranderl und Nelson, 1992; Zuo et al., 1994) an die DBD an. Charakteristisch für diesen Bereich sind sog. „Heptad hydrophobic repeats“ aus stark hydrophoben Aminosäuren (L, I, V, M, F, Q). Pflanzen Hsf des A-Typs (siehe Abb. 2) und zahlreiche andere Hsf besitzen zusätzlich eine HR-C Region am

C-Terminus des Proteins. Eine weitere Besonderheit der pflanzlichen Hsf des A-Typs ist eine 21 AS lange Insertion in der HR A/B Region (L2). Hsf des B-Typs und alle nicht pflanzlichen Hsf besitzen ein kontinuierliches Heptad Muster. Die Oligomerisierung der Hsf erfolgt höchstwahrscheinlich über eine „Coiled Coil“ Interaktion.

➤ **Kernlokalisationssequenz (NLS)**

Das Molekulargewicht von monomeren Hsf reicht von 37,4 (*Glycine max* HsfB1) bis über 100 kDa (z.B. Dm-Hsf). Im allgemeinen liegen Hsf in der Zelle jedoch nicht als Monomere, sondern als Dimere (Lp-HsfB1) bzw. Trimere vor und sind somit zu gross um den Kernporenkomplex (siehe auch 1.6) passiv zu passieren (Diffusion). Für die Interaktion mit dem Importinkomplex (siehe auch 1.7) und den aktiven Kernimport besitzen alle bekannten Hsf „Cluster“ basischer AS (sog. KR-Regionen), die auch als Kernlokalisationssequenz (NLS, nuclear localisation sequence) bezeichnet werden.

➤ **Kernexportsequenz (NES)**

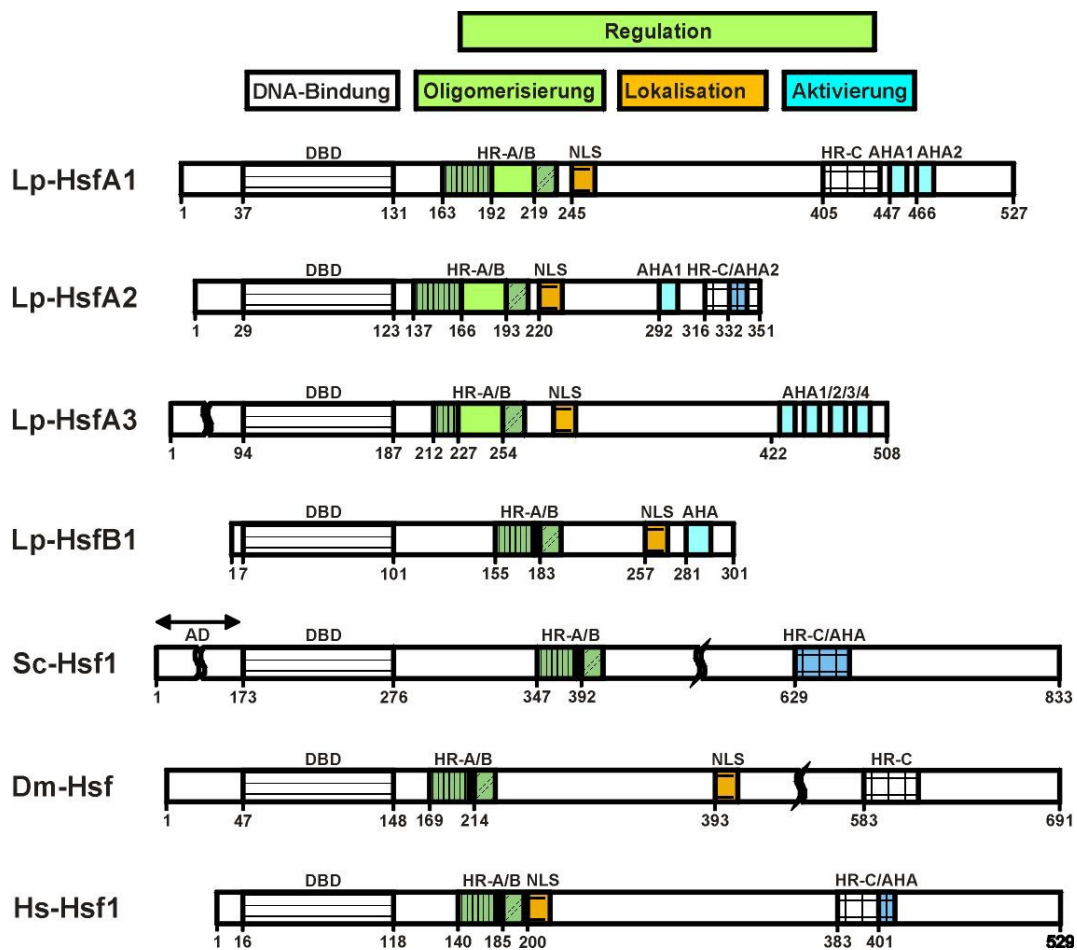
Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Importsequenzen, ist die Aminosäurekomposition der Kernexportsequenzen (NES, nuclear export sequence) weitaus weniger hoch konserviert. Ein bisher bekanntes Charakteristikum ist die Abfolge kurzer, hydrophober, leucin- und isoleucin-reicher Sequenzabschnitte.

Bei den pflanzlichen Hsf konnte bisher nur die Kernexportsequenz von HsfA2 aus Tomate identifiziert werden, die am äussersten C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (siehe Abb. 1 und Ergebnisse in dieser Arbeit; Heerklotz et al., 2001).

➤ **Aktivator-domäne (AD)**

Die C-terminale Aktivator-domäne, die für die Interaktion der an die DNA gebundenen Hsf mit dem Transkriptionsapparat verantwortlich ist, zeigt den geringsten Konservierungsgrad. Für ihre Funktion als Transkriptionsaktivator sind hauptsächlich sog. „AHA“ Motive (Scharf et al. 1998b; Doering et al., 2000) verantwortlich. Diese sind reich an aromatischen (W, F, Y), stark hydrophoben (L, I, V) und sauren (engl. acidic; E, D) Aminosäuren. Diese Elemente sind hochkonserviert, essentiell für die Transaktivierung und sind

auch in der Aktivator-domäne des humanen Hsf1 (Newton et al., 1996), *Drosophila* (Wisniewski et al., 1996) und Hefe (Chen et al., 1993) vorhanden.



**Abbildung 2: Strukturübersicht Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus Tomate (*L. peruvianum*), Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und Mensch (*Homo sapiens*).**

DBD, DNA-Bindungsdomäne; HR, Hydrophobic heptad repeats (Oligomerisierungsdomäne); NLS, Nuclear localisation sequence (Kernlokalisationssequenz).

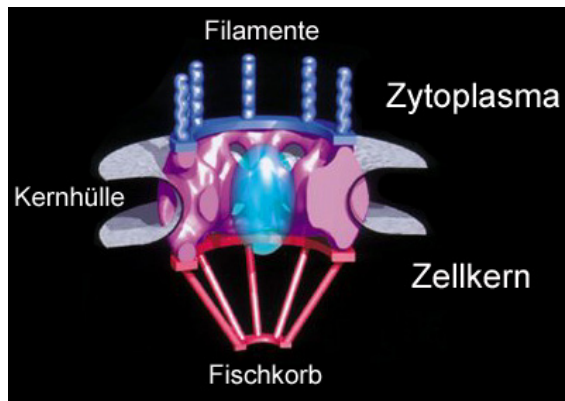
### **1.5 In eukaryontischen Zellen müssen pro Minute über eine Millionen Protein- und RNA-Moleküle aktiv über die Kernmembran transportiert werden**

Grundsätzlich wird zwischen dem Import von Makromolekülen in den Zellkern und dem Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma unterschieden. Vom Kern ins Zytoplasma müssen beispielsweise verschiedene RNA-Klassen wie Boten-RNA (m-RNA) und Transfer-RNA (t-RNA) sowie ribosomale Untereinheiten transportiert werden. Den umgekehrten Weg, vom Zytoplasma in den

Nukleus, müssen ribosomale Proteine, Transkriptionsfaktoren, snRNPs (small nuclear RNPs) und zahlreiche andere Proteine (z.B. Histone) transportiert werden.

Der Kernporenkomplex (NPC, nuclear pore complex) stellt somit die einzige bekannte Verbindung zwischen Zytoplasma und Zellkern dar. Das heutige Modell des NPC (siehe Abb. 3) basiert überwiegend auf elektronenmikroskopischen Ultrastrukturanalysen (Pante und Aebi, 1996; Ohno et al., 1998; Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999). In höheren eukaryontischen Zellen hat der NPC ein Molekulargewicht von etwa 125 MDa (Reichelt et al., 1990; Akey und Radermacher, 1993), bzw. 66 MDa bei der Bäckerhefe (Yang et al., 1998). Der NPC besteht aus ca. 1000 Proteinen, die sich wiederum aus 30-50 verschiedenen Proteinen (Nukleoporinen; Nups; Ribbeck und Görlich, 2001) zusammensetzen. Viele Nups kennzeichnen sich durch zahlreiche phenylalaninreiche Abschnitte (Ryan und Wentz, 2000), die für die Interaktion mit den Transportrezeptoren der Importin- $\beta$  Familie verantwortlich sind (Radu et al., 1995). Die Nups bilden einen grossen, wässrigen Kanal, der longitudinal in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet ist. Dieser hat einen flexiblen Durchmesser von etwa 10-25 nm (Dworetzky et al., 1988). Der membranständige Teil des NPC ist symmetrisch aufgebaut. Ganz im Gegensatz hierzu sind die ins Zyto- bzw. Karyoplasma hinausragenden Teile in Form und Proteinzusammensetzung sehr inhomogen (Nakielnny und Dreyfuss, 1999). Die 8 tentakelartigen, ins Zytoplasma ragenden Teile bezeichnet man als Filamente, den ins Nukleoplasma ragenden Teil, aufgrund seiner Form, als Fischkorb (nuclear basket; siehe Abb. 3).

Während kleine Moleküle (40-60 kDa) nach allgemeiner Auffassung auch mittels einfacher Diffusion die Kernpore durchqueren können, benötigen grössere Moleküle adäquate Transportsignale bzw. Rezeptoren (Nigg, 1997) um aktiv durch die Kernpore transportiert werden zu können. Kleinere Moleküle durchqueren den NPC im allgemeinen durch die peripheren Seitenkanäle, während grössere Moleküle rezeptorvermittelt durch den zentralen Teil der Kernpore transportiert werden. Ribbeck und Görlich (2001) konnten zeigen, dass die Transportkapazität einer Kernpore etwa 100 MDa/sek beträgt und sich Moleküle mit etwa 0,5  $\mu\text{m}/\text{sek}$  durch die Kernpore bewegen.



**Abbildung 3: 3D-Rekonstruktion des Kernporenkomplexes nach Pante und Aebi**

In eukaryontischen Zellen ist der Kernporenkomplex (NPC, nuclear pore complex) eine makromolekulare Struktur mit einer Masse von etwa 125 MDa. Eingebettet in die Kernhülle besteht er aus: (i) einem ringförmig zusammengesetzten zentralen Porenkanal aus 8 Multi-proteindomänen (Speichen), die jeweils aus fast identischen Hälften bestehen, (ii) einem zytoplasmatischen Ring aus dem 8 kurze, spiralförmige, ins Zytoplasma ragende Filamente hervorgehen und (iii) einem nukleoplasmatischen Ring, von dem aus sich eine korbartige Struktur aus 8 Filamenten ins Nukleoplasma erstreckt.

### 1.6 Import- und Exportsequenzen

Die erste beschriebene „klassische“ Kernimportsequenz war die des grossen SV40 T-Antigens (PKKKRKV). Dieser monopartite Typ wird deshalb oft auch als SV40-Typ bezeichnet. Die NLS von Nukleoplasmin hingegen gehört in die Gruppe der bipartiten Kernimportsequenzen (KRPAAIKKAGQAKKKK; Görlich und Mattaj, 1996; Weis, 1998). Eine weitere beschriebene Importsequenz ist die 38 AS-lange M9-Domäne von hnRNP A1 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein; Siomi und Dreyfuss, 1995; Weighardt et al., 1995). Michael et al. (1995) konnten nachweisen, dass interessanterweise die gleiche M9-Domäne auch für den Re-Export ins Zytoplasma verantwortlich ist (siehe auch Tab. 1).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Importsequenzen, die sich meist aus „Clustern“ basischer Aminosäuren zusammensetzen (siehe auch NLS von Hsf), sind die bisher beschriebenen Exportsequenzen weitaus heterogener in ihrer Komposition und häufig schwer zu erkennen. Das einzige zur Zeit bekannte Muster sind Abschnitte hydrophober AS, die insbesondere zahlreiche Leucine und Isoleucine enthalten (Weis, 1998; siehe auch Tabelle 1). So konnten auch erst 1995 die ersten Exportsignale im HIV-Rev

Protein (Fischer et al., 1995) und im cAMP-abhängigen Inhibitor der Protein Kinase A (PKI; Wen et al., 1995) identifiziert werden.

Mittlerweile sind zahlreiche weitere Exportsequenzen auch in pflanzlichen Proteinen identifiziert worden. Eine Auswahl einiger identifizierter NES-Sequenzen inklusive der sog. M9-Sequenz von hnRNP A1 (Michael et al., 1995) und der KNS-Domäne von hnRNP K (Michael et al., 1997) ist in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

<b>leucinreiche Exportsequenzen</b>		
<b>Protein (Abkürzung, Organismus)</b>	<b>Literatur</b>	<b>Sequenz</b>
cAMP Protein Kinase Inhibitor (PKI; Ratte)	Wen et al., 1995	ELALKLAGLDIN
Rev-Protein (HIV-1)	Fischer et al., 1995	LQLPPLERLTLD
TFIIA (Xenopus)	Fridell et al., 1996	SLVLDKLTl
MAPKK (Mensch)	Fukuda et al., 1996	ALQKKLEELELD
c-Abl (Mensch)	Taagepera et al., 1998	LESLNRELQIC
Cyclin B (Mensch)	Toyoshima et al., 1998	DLCQAFSDVILAVN
$\alpha$ -Aktin (Hefe)	Wada et al., 1998	NES1: ALPHAIMRLDLA; NES2: DIKEKLCYVALD
p53 (Mensch)	Stommel et al., 1999	MFRELNEALELK
SqLCV BR1 (Virales Movement Protein des Squash leaf curl Virus)	Ward und Lazarowitz, 1999	VTKRVSLEKDTLLIDLHGTTQ L
NF-AT (Mensch)	Zhu und McKeon, 1999	AIVAAINALTT
Stat1 (Mensch)	McBride et al., 2000	SLAAEFRHLQLK
LPP (Mensch)	Petite et al., 2000	LDAEIDSLTSIL
Smad4 (Mensch)	Watanabe et al., 2000	SPGIDLSGLTLQ
HsfA2 (Tomate)	Heerklotz et al., 2001	LVDQLGFL
<b>M9 Sequenz von hnRNP A1</b>		
hnRNP A1 (Mensch)	Michael et al., 1995	NQSSNFGPMKGNFGGGRSS- GPYGGGGQYFAKPRNQGGY
<b>KNS Domäne von hnRNP K</b>		
hnRNP K (Mensch)	Michael et al., 1997	GFSADETWDSaidTWSPSEWQ MAY

**Tabelle 1: Auswahl bereits identifizierter Exportsequenzen**

### **1.7 Import- und Exportrezeptoren**

Die meisten Proteine werden von Kerntransportrezeptoren ( $\beta$ -Karyopherine in Vertebraten, bzw. Kaps in Hefe) der Importin- $\beta$ -Familie transportiert (Ohno et



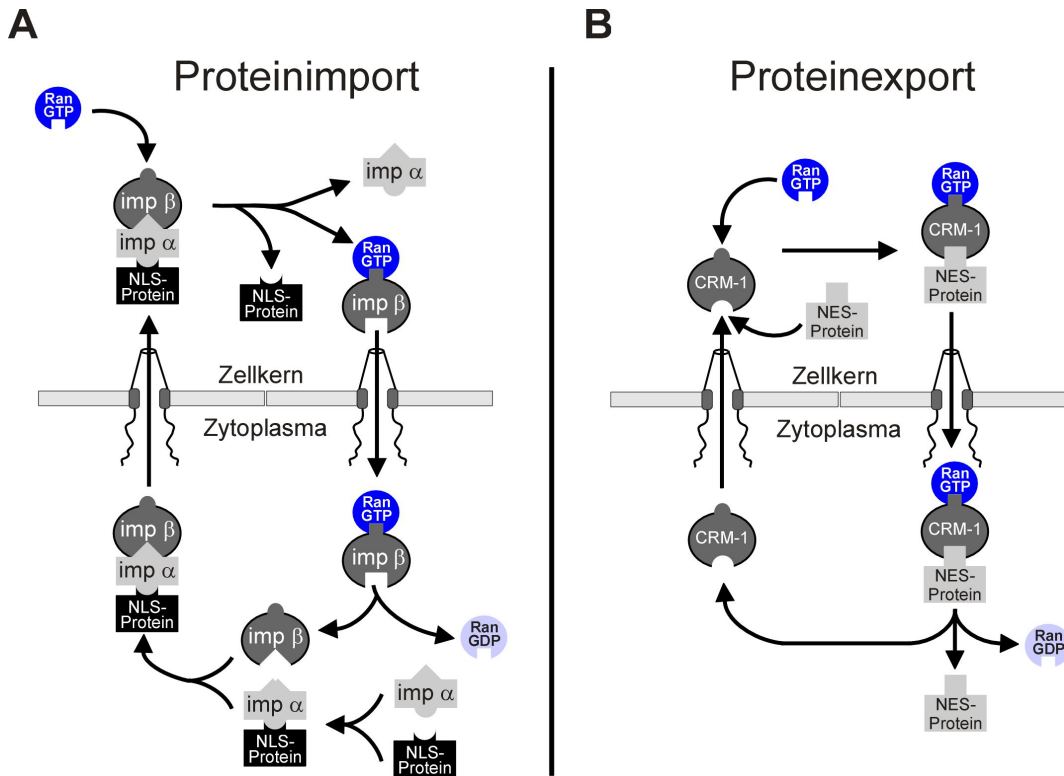
al., 1998). Sie werden je nach Transportrichtung als Importine bzw. Exportine bezeichnet, besitzen eine aminoterminalen Ran-Bindungsdomäne und sind in der Lage zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herzuwandern. Die Bindung der Rezeptoren erfolgt entweder direkt oder über ein Adapterprotein (z.B. Importin- $\alpha$ ; siehe Abb. 4) an die Importsequenz von Makromolekülen und ermöglicht zusammen mit der kleinen GTPase Ran den Transfer durch den Kernporenkomplex.

Die Vielfalt der Adapterproteine in höheren Eukaryonten führt zu einer erhöhten kombinatorischen Flexibilität und ermöglicht, dass eine Vielzahl von Proteinen mit adäquaten Importsignalen mittels Importin- $\beta$  transportiert werden kann (Holaska et al., 2001). In Vertebraten konnten neben Importin- $\alpha$ , Snurportin, XRIPa, Importin7 und RanBP8 als Adapterproteine identifiziert werden (Görlisch und Kutay, 1999).

Die bisher identifizierten Exportrezeptoren binden im Kern zusammen mit RanGTP direkt an die Exportsequenz ihrer Kargomoleküle, wobei diese indirekt auch als „Adapter“ fungieren können, falls sie noch andere Proteine oder RNA gebunden haben.

In den letzten Jahren konnten vier Exportrezeptoren identifiziert werden. Der wohl bekannteste unter ihnen ist Crm-1 bzw. Exportin-1 (Fornerod et al., 1997a), der an leucinreiche Exportsignale von Kargoproteinen bindet und diese zusammen mit RanGTP ins Zytoplasma transportiert (siehe Abb. 4). Für den Export von t-RNA ist Exportin-t verantwortlich (Kutay et al., 1998). Zahlreiche Transkriptionsfaktoren in Hefe, wie beispielsweise die phosphorylierte Form von Pho4, werden mit Hilfe von Msn5p ins Zytoplasma reexportiert (siehe auch Abb. 24, Kaffman et al., 1998b). Ferner wird das Adapterprotein Importin- $\alpha$  mit Hilfe von CAS ins Zytoplasma zurücktransportiert (siehe auch Legende von Abb. 4; Kutay et al., 1997; Hood und Silver, 1998). Einige experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass Crm-1 auch am Export von mRNA beteiligt ist (Stade et al., 1997), was jedoch noch sehr umstritten ist (Neville und Rosbash, 1999). Die Tatsache, dass alle anderen putativen mRNA Exportrezeptoren im Gegensatz zu Crm-1 nicht zur Importin- $\beta$  Familie gehören kann jedoch als Indiz für einen bisher unbekannten Importin- $\beta$  unabhängigen mRNA-Transportmechanismus interpretiert werden (Holaska et al., 2001). Ebenso scheint es auch Exportrezeptoren für

leucinreiche Exportsignale zu geben, die nicht der Importin- $\beta$ -Familie angehören. Holaska et al. (2001) konnten zeigen, dass das Calcium-bindende Protein Calreticulin, das im Lumen des ER an Proteinfaltungsvorgängen beteiligt ist, genau wie Crm-1, Proteine mit leucinreichen Exportsignalen (PKI, HIV-Rev) aus dem Kern exportieren kann.



**Abbildung 4: Übersicht Kernimport und Export von Proteinen nach Ohno et al. (1998)**

Abbildungsteil A: Beim receptorvermittelten Import von „klassischen“ NLS-Proteinen wie z.B. Nukleoplasmin bindet Importin  $\beta$  über einen Adapter (Importin  $\alpha$ ) an das NLS-Protein. Nachdem der Komplex die Kernpore durchquert hat, führt im Zellkern die Bindung von Ran-GTP zur Freigabe des Kargoproteins. Importin  $\beta$  wird zusammen mit Ran-GTP, der Adapter nach Bindung an CAS (Exportrezeptor für Importin  $\alpha$ ; nicht gezeigt) und Ran-GTP ins Zytoplasma zurücktransportiert.

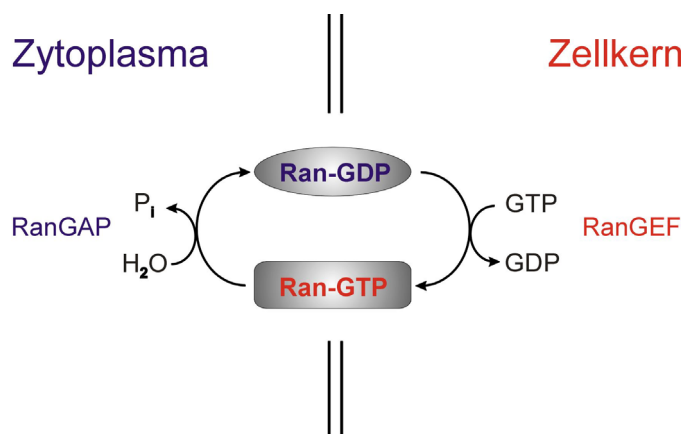
Abbildungsteil B: Beim Crm-1 (Exportin-1) vermittelten Export binden die NES-Proteine (z.B. HIV-Rev) und Ran-GTP kooperativ an den Exportrezeptor und werden ins Zytoplasma transportiert. Der Komplex dissoziiert im Zytoplasma, wenn Ran-GTP durch RanGAP (Ran GTP activating protein) hydrolysiert wird. Der unbeladene Exportrezeptor wandert anschliessend wieder zurück in den Zellkern.

### 1.8 Die Funktion der kleinen GTPase Ran beim Transport

Während Ran gleichverteilt in der Zelle vorliegt, sind seine beiden Regulatorproteine kompartimentiert. Das Ran-GTPase aktivierende Protein (RanGAP) ist überwiegend im Zytoplasma, wohingegen der sog. Ran-GTP

Austauschfaktor RCC1 chromatingebunden (RanGEF, Ran guanine nucleotide exchange factor) im Zellkern lokalisiert ist.

Der sog. Ran-GTP-Zyklus (siehe Abb. 4), führt zu GTP-gebundenem Ran im Zellkern und einer GDP-gebundenen Form im Zytoplasma. Die Transportrichtung von Proteinen wird somit höchstwahrscheinlich über den RanGTP Gradienten bestimmt (Komeili und O'Shea, 2000). Während in früheren Modellen angenommen wurde, dass durch die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP die für die Translokation nötige Energie bereitgestellt wurde (Übersicht in Moore, 1998) konnten neuere Studien zeigen, dass die Bindung von RanGTP an einen Importrezeptor zur Freigabe des Kargoproteins im Zellkern führt (Übersicht in Görlich und Kutay, 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Exportrezeptor nur in Anwesenheit von Ran-GTP einen Komplex mit seinem Kargomolekül bilden kann (Görlich et al., 1997).



**Abbildung 5: Ran-GTP Zyklus.**

Die kleine GTPase Ran kommt sowohl in einer GTP als auch in einer GDP gebundenen Form in der Zelle vor. Durch die kompartimentierte Verteilung der Regulatorproteine RanGAP (Ran GTP activating protein) und RanGEF (Ran guanine nucleotide exchange factor), kommt nukleoplasmatisches Ran überwiegend als Ran-GTP und zytoplasmatisches Ran als Ran-GDP vor.

### **1.9 Fragestellungen und Ziele der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung pflanzlicher Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus *Lycopersicon peruvianum* (Perutomate) in heterologen Expressionssystemen. Im Vordergrund stand die Untersuchung der Kernimport- und Exportdynamik von HsfA2 und dessen Interaktion mit niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17-Familie. Als Modellsysteme für

die Untersuchungen wurden sowohl CHO-K1 Zellen, als auch Tabakprotoplasten verwendet.

### **Expression von Tomaten-Hsf und Imw-Hsp in CHO-K1 Zellen und Tabakprotoplasten**

#### ➤ Konstruktion von Hsf kodierenden Expressionsplasmiden

Um die Untersuchung von Tomaten-Hsf auch in einem nichtpflanzlichen System zu ermöglichen, sollten entsprechende Hsf kodierende Plasmide für die Expression in Säugerzellen konstruiert werden. Im Vordergrund stand hierbei auch die Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen, um die Lokalisation von Hsf direkt zu ermöglichen. Ferner sollten verschiedene Imw-Hsp kodierenden Plasmide für die Expression in Säugerzellen hergestellt werden.

#### ➤ Transiente Expression in CHO-K1 Zellen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz bzw. der GFP-Autofluoreszenz sollte die Lokalisation der in CHO-K1 Zellen transient exprimierten Tomaten-Hsf bzw. Imw-Hsp dargestellt werden. Der quantitative Nachweis der Proteine sollte mit Hilfe der Western-Blot Analyse erfolgen.

#### ➤ Transiente Expression von Tomaten-Hsf in Tabakprotoplasten

Um die in CHO-K1 Zellen gewonnenen Daten zu verifizieren stand die parallele Untersuchung in einem pflanzlichen Expressionssystem bei allen wichtigen Versuchen im Vordergrund. Hierzu sollten die entsprechenden pflanzlichen Hsf-Expressionsplasmide in Tabakmesophyllprotoplasten exprimiert, und die Expression wie in CHO-K1 Zellen sowohl qualitativ als auch quantitativ überprüft werden.

#### ➤ Luciferasereporterassays in CHO-K1 Zellen

Um das Transaktivierungspotential einzelner, oder in Kombination exprimierter Hsf-Konstrukte in CHO-K1 Zellen bestimmen zu können, sollten entsprechende Hsf-aktivierbare Luciferasereporter-Konstrukte zusammen mit Tomaten-Hsf in CHO-K1 Zellen exprimiert und die Luciferaseaktivität gemessen werden. Ferner sollte der Einfluss koexprimierter Imw-Hsp auf die Aktivität von HsfA2 überprüft werden.

## **Untersuchung wichtiger Struktureigenschaften für den Im- und Export von HsfA2**

HsfA2 ist trotz einer funktionellen Kernimportsequenz ein überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein. Nur bei gleichzeitiger Expression von HsfA1 kann HsfA2 im Zellkern nachgewiesen werden. Ausgehend von dieser Beobachtung ergaben sich die folgenden Fragestellungen, die in den beiden genannten Expressionssystemen untersucht werden sollten:

- Kann HsfA2 auch ohne die Interaktion mit HsfA1 in den Zellkern importiert werden?
- Gibt es neben der Import- möglicherweise auch eine Exportsequenz?
- Welche Strukturmerkmale sind für einen Kotransport essentiell?
- Welchen Einfluss hat Hitzestress auf die Lokalisation von HsfA2?
- Besteht zwischen der Lokalisation von HsfA2 und seiner Aktivität als Transkriptionsaktivator ein direkter Zusammenhang?

## **Interaktion von HsfA2 mit Chaperonkomplexen der Hsp17-Familie**

Ein andauernder Hitzestress führt bei Pflanzenzellen zur Bildung grosser zytoplasmatischer Hitzestressgranula-Komplexe. In Tomatenzellen bestehen Hitzestressgranula grösstenteils aus niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17-Familie und HsfA2. Mit der heterologen Expression dieser Proteine, sowohl in Tabakprotoplasten als auch in CHO-K1 Zellen, wurden folgende Fragestellungen verbunden:

- Führt die Überexpression beider Proteine zwangsläufig zur Bildung hochmolekularer Komplexe?
- Entstehen HSG-ähnliche Komplexe unabhängig vom Expressionssystem?
- Gibt es eine klassenspezifische Interaktion von Lp-Hsp17(II) mit HsfA2?
- Ist die für die Hsf-Oligomerisierung notwendige HR-A/B Region auch für die Interaktion mit Imw-Hsp erforderlich?
- Führt die Interaktion mit Imw-Hsp zum Verlust der Transkriptionsaktivität von HsfA2?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Klonierungen allgemein

Alle Klonierungen und molekularen Manipulationen (Restriktionen und Ligationen) an Desoxyribonukleinsäuren (DNA) wurden mit Enzymen der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bzw. MBI-Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des entsprechenden Herstellers durchgeführt. Die hierfür angewandten Methoden beruhen auf der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989). Die Überprüfung einzelner Klonierungsschritte erfolgte immer durch Testspaltungen und Analyse der erhaltenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese. Alle in der Arbeit beschriebenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Für die Herstellung der in der Arbeit benötigten Expressionsplasmide kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung, die im folgenden beschrieben werden:

#### ♦ Umsetzen von Inserts

Sofern der Ursprungsvektor kompatible Schnittstellen für die Umklonierung der gewünschten Insert-DNA besass, wurden diese durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten, die DNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Inserts mit Hilfe eines QiaEX II Gelextraktions-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die erhaltenen Inserts wurden dann gerichtet in den Zielvektor subkloniert.

#### ♦ Subklonierung von PCR-amplifizierten DNA-Inserts

Falls ein einfaches Umsetzen der gewünschten cDNA-Fragmente nicht möglich war, wurden die Inserts mit Hilfe der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) vervielfältigt. Hierbei wurden die gewünschten Schnittstellen über mutagenisierende 5' (forward; engl. vorwärtsorientierte) und/oder 3' (revers; engl. rückwärtsorientierte) Primer eingefügt. Die für diese Reaktionen verwendeten Primer und deren Bindungsstellen sind im Anhang gesondert aufgeführt. Alle PCR-Ansätze wurden unter Verwendung des „Taq-Plus-Precision“-PCR-Systems (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Herstellerangaben mit einem GeneAmp-PCR-System 9600 (Applied

Biosystems, Langen, Deutschland) und folgendem Temperaturprofil durchgeführt.

5 min	95 °C	
30 s	94 °C	} 30 Zyklen
30 s	55 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	
∞	4 °C	

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschliessend mit einem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt, wie bereits beschrieben mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den entsprechenden Zielvektor subkloniert.

## **2.2 Vermehrung von DNA für die Expression in pflanzlichen und tierischen Zellen**

Die Vermehrung der DNA erfolgte ausschliesslich in kompetenten *E. coli* Zellen des Stammes DH5 $\alpha$ . Die Isolation der Plasmide für die Expression in Tabakmesophyllprotoplasten erfolgte durch eine Plasmid Midi Präparation (Sambrook et al. 1989), wobei die isolierte Plasmid-DNA zusätzlich mit RNase-A, RNase-T1 und Proteinase K (Roche Diagnostics) behandelt wurde. DNA für die Expression in CHO-K1 Zellen wurde ausschliesslich mit einem Plasmid Midi Kit (Qiagen) isoliert.

## **2.3 Expressionsplasmide**

Im folgenden Abschnitt sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und deren Konstruktion tabellarisch aufgeführt. Detaillierte Plasmidkarten befinden sich gesondert im Anhang und sind im Arbeitskreis (AK) Nover dokumentiert.

### 2.3.1 Plasmide zur Expression in pflanzlichen Zellen

Alle pflanzlichen Expressionsplasmide basierten auf dem von Töpfer et al. (1988) beschriebenen pRT101-Vektor bzw. auf dem von Reichel et al. (1996) beschriebenen pCK-GFP S65C Vektor. Im nachfolgenden Text wird der pCK-GFP S65C Vektor jedoch aus didaktischen Gründen als pRTds bezeichnet, da er im Gegensatz zum pRT101-Vektor einen modifizierten CaMV35S Promotor mit duplizierten Transkriptions Enhancer-Element besass. Alle Vektoren besaßen für die Selektion in Bakterien eine Ampicilin (Amp) Resistenz.

Expressionsplasmide für Pflanzenzellen		
Abkürzung	Beschreibung des Vektors	Klonierungsstrategie oder Referenz
pRTds-GFP-HsfA1	pRTds-GFP (AS 1-237) x <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA1 (AS 24-527)	PCR-Amplifikation von Lp-HsfA1 in pBlISK+, 5' Primer mit SacI-Schnittstelle (Nr.352), 3' Primer mit XbaI-Schnittstelle (Nr.353), Subklonierung in pRTds-GFP über SacI, XbaI
pRT-HsfA2	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 (AS 1-351)	Treuter et al., 1993, Heerklotz et al., 2001
pRTds-GFP-HsfA2	pRTds-GFP (AS 1-237) x <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 (AS 1-351)	SacI/XbaI HsfA2-Insert aus pRTHsfA2 über SacI/XbaI in pRTds-GFP
pRT-HsfA2 $\Delta$ 7/8	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 $\Delta$ 7/8 (AS 1-136, VD, 213-351)	Promotion E. Treuter, Heerklotz et al., 2001
pRT-HsfA2M4	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2M4 (AS 1-351, L344A, L348A, L351A)	PCR-Amplifikation von Lp-HsfA2 in pRT101, 5' Primer mit NcoI-Schnittstelle (Nr. 333), 3' Primer mit XbaI-Schnittstelle (Nr. 339), Subklonierung in pRT-HsfA2 $\Delta$ C323
pRTds-GFP-HsfA2M4	pRTds-GFP (AS 1-237) x <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 (AS 1-351, L344A, L348A, L351A)	BamHI/XbaI HsfA2M4-Insert aus pRTHsfA2M4 über BamHI/XbaI in pRTds-GFP-HsfA2
pRT-HsfB1	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfB1 (AS 1-301)	Treuter et al., 1993
pRT-HsfB1xNES(A2)	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfB1 (AS 1-294, VD) x HsfA2 (AS 331-351)	BglII/XbaI HsfA2-Insert aus pRTHsfA2 über BglII/XbaI in pRT-HsfB1.22
pRT-Lp-Hsp17(I)	pRTds- <i>Lycopersicon peruvianum</i> Hsp 17,7A Klasse I (AS 1-154)	NcoI-XbaI Hsp17,6A-I-Insert aus pRT-Lp-Hsp17,6A-I über NcoI-XbaI in pRTds-GFP
pRT-Lp-Hsp17(II)	pRT- <i>Lycopersicon peruvianum</i> Hsp 17 Klasse II (AS 1-155)	EcoRI/XbaI Hsp17(II)-Insert aus pAD-Gal4+Lp Hsp17 Klasse II (Klon 2.4, isoliert mittels 2-Hybrid Screening, R. Lyck, AK Nover) über EcoRI/XbaI in pRT101



### 2.3.2 Plasmide zur Expression in Säugerzellen

Die verwendeten Plasmide basierten alle auf dem von Invitrogen (Amsterdam, Niederlande) vertriebenen pcDNA3 Vektor bzw. auf den von Clontech (Heidelberg, Deutschland) vertriebenen Living Colors Vektoren. Bei allen Vektoren standen die zu exprimierenden Proteine unter der Kontrolle eines CMV (Cyto Megalo Virus) Promotors und besaßen zur Selektion in Bakterien eine Ampicillin (pcDNA3) bzw. eine Kanamycin (Kan, Living Colors Vektoren) Resistenz.

Expressionsplasmide für Säugerzellen		
Abkürzung	Beschreibung des Vektors	Klonierungsstrategie oder Referenz
pcDNA3-HsfA1	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA1</b> (AS 23-527)	XhoI/XbaI HsfA1-Insert aus pBSE8LS über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-GFP-HsfA1	pcDNA3-GFP (AS 1-237)x <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA1</b> (AS24-527)	EcoRI/XbaI GFP-HsfA1-Insert aus pRTds-GFP-HsfA1 über EcoRI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA1ΔC394	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA1</b> (AS 23-394+AS)	XhoI/XbaI HsfA1ΔC394-Insert aus pRT-HsfA1ΔC394 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA1ΔC412	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA1</b> (AS 23-412+TDI)	XhoI/XbaI HsfA1ΔC412-Insert aus pRT-HsfA1ΔC412 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA1ΔC451	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA1</b> (AS 23-451)	XhoI/XbaI HsfA1ΔC451-Insert aus pRT-HsfA1ΔC451 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA2	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA2</b> (AS 1-351)	XhoI/XbaI HsfA2-Insert aus pBSE30 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA2ΔC343	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA2</b> (AS 1-343)	XhoI/XbaI HsfA2ΔC343-Insert aus pRT-HsfA2ΔC343 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pcDNA3-HsfA2M4	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA2</b> (AS 1-351, L344A, L348A, L351A)	XhoI/XbaI HsfA2M4-Insert aus pRT-HsfA2M4 über XhoI/XbaI in pcDNA3
pEGFP-C1 HsfA2	pEGFP-C1 (AS 1-302)x <i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA2</b> (AS 2-351)	PCR-Amplifikation von <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 in pRT-HsfA2, 5' Primer mit HindIII-Schnittstelle (Nr. 390), 3' Primer mit Asp718I-Schnittstelle (Nr. 391), Subklonierung in pEGFP-C1 über HindIII, Asp718I.
pDsRed-N1 HsfA2	<i>Lycopersicon peruvianum</i> <b>HsfA2</b> (AS 1-351)x pDsRed-N1 (AS 1-266)	PCR-Amplifikation von <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 in pRT-HsfA2, 5' Primer (Nr. 270), 3' Primer (Nr. 654) mit Apal-Schnittstelle, Subklonierung in pDsRed-N1 über XhoI, Apal

Expressionsplasmide für Säugerzellen		
<b>pECFP-N1 HsfA2</b>	<i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 (AS 1-351)xpECFP-N1 (AS 1-239)	PCR-Amplifikation von <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 in pRT-HsfA2, 5' Primer (Nr. 270), 3' Primer (Nr. 654) mit Apal-Schnittstelle, Subklonierung in pECFP-N1 über XhoI, Apal
<b>pcDNA3-HsfA2<math>\Delta</math>7/8</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2 $\Delta$ 7/8 (AS 1-136, VD, 213-351)	XhoI/XbaI HsfA2 $\Delta$ 7/8-Insert aus pRT-HsfA2 $\Delta$ 7/8 über XhoI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-HsfA2M2</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2M2 (AS 1-351, K119Q, R120S, R121T)	XhoI/XbaI HsfA2M2-Insert aus pRT-HsfA2M2 über XhoI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-HsfA2M3</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfA2M3 (AS 1-351, K228Q, R229S, R230T)	XhoI/XbaI HsfA2M3-Insert aus pRT-HsfA2M3 über XhoI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-HsfB1</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfB1 (AS 1-301)	XhoI/XbaI HsfB1-Insert aus pBSE24LS über XhoI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-HsfB1xA2(NES)</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> HsfB1 (AS 1-294, VD) x HsfA2 (AS 331-351)	XhoI/XbaI HsfB1xA2(NES)-Insert aus pRT-HsfB1-NES(A2) über XhoI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-Ps-Hsp17(II)</b>	pcDNA3- <i>Pisum sativum</i> Hsp 17,7 Klasse II (AS 1-152)	PCR-Amplifikation von Ps-Hsp 17,7 in pBSK (E. Vierling), 5' Primer (M13), 3' Primer mit XbaI- Schnittstelle (Nr. 211), über EcoRI/XbaI in pcDNA3
<b>pcDNA3-Lp-Hsp17(II)2.4</b>	pcDNA3- <i>Lycopersicon peruvianum</i> Hsp17 Klasse II (2.4)	EcoRI/XbaI Hsp17(II)-Inserts aus pRT-Lp-Hsp17(II)2.4 über EcoRI/XbaI in pcDNA3

Luciferase-Reporter-Konstrukte für Säugerzellen		
Abkürzung	Beschreibung des Vektors	Klonierungsstrategie oder Referenz
<b>pHsp17-luc</b>	pGL3- <i>Glycine max</i> Hsp17.3-luc	PCR-Amplifikation des Hsp17.3B Promotors in pHsp17gus, 5' Primer (Nr. 587) mit Asp718I-Schnittstelle, 3' Primer (Nr. 285), über Asp718I/SmaI in pGL3-basic (Promega, Mannheim, Deutschland)
<b>pHsp17*-luc</b>	pGL3- <i>Glycine max</i> Hsp17.3-luc (TaqI-Fragment des Gm-Hsp17.3B Promotors)	PCR-Amplifikation des Hsp17.3B Promotors in pHsp17gus*, 5' Primer (Nr. 585) mit Asp718I-Schnittstelle, 3' Primer (Nr. 586) mit SmaI-Schnittstelle, über Asp718I/SmaI in pGL3-basic (Promega)
<b>pHsp70-luc</b>	<i>H. sapiens</i> Hsp70 Promotor-luc	Williams et al., 1989

## **2.4 Zellkultur**

Alle Arbeiten mit pflanzlichen und tierischen Zellen erfolgten an einer Laminar-Box und wurden mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

### **2.4.1 Tomatensuspensionszellkultur von *Lycopersicon peruvianum***

Die Tomatensuspensionszellkultur (Nover et al., 1982) wurde in einer dunklen Klimakammer bei 24 °C in Glaskolben auf Rundschüttlern bei 145 U/min kultiviert. Zur Erhaltung der Kultur wurden die Zellen nach jeweils 3 Tagen in neue Kulturgefäße überimpft. Zellen, welche für die Experimente verwendet wurden, waren 2 Tage zuvor in neues Kulturmedium überimpft worden und befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase.

### **2.4.2 CHO-K1 Zellen**

Die Kultivierung von CHO-K1 Zellen (Chinese Hamster Ovary) erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in Hams-F12 Kultur-Medium (Life Technology, Eggenstein, Deutschland), dem 10 % Fetales Kälber Serum (Life Technology) und 5 % Penicilin/Streptomycin (Life Technology) zugesetzt wurden. Die Zellen wurde in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit Schraubverschluss (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert und 3 mal wöchentlich in neues Kulturmedium passagiert. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, 137 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,6 mM KCl; pH 7,4) gewaschen und anschliessend mit 1 ml Trypsin/EDTA (Life Technology) vom Flaschenboden abgelöst. Die Reaktion wurde 5 Minuten später durch Zugabe von 4-6 ml frischem Kulturmedium gestoppt. Nachfolgend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in neue Kulturflaschen überführt, die bereits 4 ml frisches Medium enthielt.

## **2.5 Isolierung und Aufarbeitung von Tabakmesophyllprotoplasten**

Zur Isolation von Mesophyllprotoplasten wurden die Blätter von 6-8 Wochen alten, steril angezogenen Tabakpflanzen (*Nicotiana glauca*) in eine mit 20 ml Enzymlösung (Treuter et al., 1993) gefüllte Petrischale gelegt. Mit

einem sterilen Skalpel wurde die obere Epidermis mehrfach angeritzt und die Blätter mit der Oberseite nach unten über Nacht im Dunkeln bei 26 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Protoplasten durch vorsichtiges Schwenken der Petrischale aus den Blattresten herausgelöst, und durch Filtration durch ein Sieb (Maschenweite 1 mm) von diesen getrennt. Noch in der Petrischale verbliebene Protoplasten wurden mit 10 ml K3S-Medium (Treuter et al., 1993) herausgespült, die Protoplastensuspension auf 10 ml Glaszentrifugenröhrchen verteilt und bei 500 Upm (40xg) für 5 min zentrifugiert (TC6, Sorvall, Rotor H400, Du Pont, Bad Homburg, Deutschland). Nach der Zentrifugation befanden sich Blattreste, Zellbruchstücke oder verletzte Protoplasten im Sediment, wohingegen intakte Protoplasten als dunkelgrüne Bande an der Oberfläche des Röhrchens flottierten. Mit einer Pasteurpipette wurde die obere Bande mit den intakten Protoplasten abgesaugt und in einem frischen Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Waschlösung (50 mM MES-Puffer pH 5,7; 0,1 % Glukose; 125 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 154 mM NaCl; 5,3 mM KCl) gewaschen und bei 700 Upm (70xg) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten erneut gewaschen. Die Bestimmung der Protoplastenkonzentration erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Mit K3M-Medium (Treuter et al., 1993) wurde die Konzentration auf etwa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

## **2.6 Transfektion von Tabakmesophyllprotoplasten**

Die Transfektion von Tabakmesophyllprotoplasten erfolgte durch direkten, Polyethylenglycol-(PEG) vermittelten DNA-Transfer (Krens et al., 1982; Pröls et al., 1988). Hierzu wurden 100 µl Protoplastensuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen) mit der entsprechenden Plasmid-DNA (20 µg) und 100 µl PEG-Lösung (25 % PEG 6000; 450 mM Mannitol; 100 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; pH 5,7) versetzt und für 20 min inkubiert. Bei Ansätzen mit ungleichen DNA-Mengen wurde die DNA-Gesamtmenge mit pRT-Vektor ohne Insert (sog. mock-DNA) angeglichen. Durch Zugabe von 1 ml K3M-Medium wurde die Transfektion abgestoppt. Zur Expression der plasmidkodierte Proteine wurden die Protoplasten für 16-20 h unter Dauerlicht kultiviert.

## 2.7 Transfektion von CHO-K1 Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen jeweils am Vortag in Kammerobjektträger (Nunc), bzw. 24-well Kulturschalen (Nunc) ausgesät, so dass sie 24 h später zu etwa 50-60 % konfluent gewachsen waren. Die Transfektion erfolgte dann mit Hilfe des Transfektionsreagenz FUGENE 6 (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Die DNA- und FUGENE 6-Konzentrationen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Im allgemeinen wurde ein Verhältniss DNA/FUGENE 6 von 1:3 gewählt. Der Expressionszeitraum lag bei allen Versuchen zwischen 20-24 h (Immunfluoreszenz, IMF) und 36-40 h (Luciferase Assay).

## 2.8 Antiseren

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Diese Antikörper wurden für die Western-Blot-Analyse (WB), die indirekte Immunfluoreszenz (IMF) als auch für den immunologischen Nachweis von Proteinen auf Ultradünnschnitten (IEM) verwendet. Bei den Antikörpern handelte es sich sowohl um polyklonale (pc) als auch um monoklonale (mc) Antiseren. Für den elektronenmikroskopischen Nachweis wurden ausschliesslich affinitätsgereinigte Antiseren verwendet.

Primäre Antikörper gegen Hsf aus <i>L. peruvianum</i>				
Antikörper	Organismus	Verdünnung WB/IMF/IEM	Hersteller und Referenz	
anti-HsfA1	Kanichen, pc	1:10000/1:500/-	aus dem Arbeitskreis	Scharf et al., 1998a,
anti-HsfA2	Kanichen, pc	1:10000/1:500/1:200		
anti-HsfA2-pep6	Kanichen, pc	1:5000/-/-		Bharti et al., 2000
anti-HsfA3	Kanichen, pc	1:2000/-/1:50		
anti-HsfB1	Kanichen, pc	1:10000/1:500/-		Scharf et al., 1998a
Primäre Antikörper gegen Imw-Hsp				
anti- <i>P.sativum</i> Hsp17 Klasse I	Kaninchen, pc	1:2000/1:400/1:400	aus dem Arbeitskreis	Kirschner et al., 2000
anti- <i>P.sativum</i> Hsp17 Klasse I	Meerschweinchen, pc	1:2000/1:400/1:400		
anti- <i>P.sativum</i> Hsp17 Klasse II	Kaninchen, pc	1:2000/1:400/1:400		

Fortsetzung Tabelle 2				
Primäre Antikörper gegen Zytoskelettproteine				
anti- $\beta$ -Tubulin	Maus, mc	-/1:400/-	Amersham, Uppsala, Sweden	-
anti-Vimentin	Maus, mc	-/1:100/-	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	-

**Tabelle 2: Übersicht primäre Antikörper**

IEM, Immunoelektronenmikroskopie; IMF, Immunfluoreszenz; mc, monoklonal; pc, polyklonal; WB, Western-Blot

Sekundärantikörper für die Lichtmikroskopie				
Antikörper	Organismus	Verdünnung WB/IMF/IEM	Hersteller und Referenz	
Cy2- bzw. Cy3-gekoppelte anti-Kaninchen aus Ziege	Ziege, pc	-/1:500 (Cy2) 1:1000 (Cy3)/-	Dianova, Hamburg, Deutschland	-
Cy2- bzw. Cy3-gekoppelte anti-Meerschweinchen aus Ziege	Ziege, pc	-/1:500 (Cy2) 1:1000 (Cy3)/-		-
Cy2- bzw. Cy3-gekoppelte anti-Maus aus Ziege	Ziege, pc	-/1:500 (Cy2) 1:1000 (Cy3)/-		-
Sekundärantikörper für die Elektronenmikroskopie				
12- bzw. 18 nm Gold-gekoppelte anti-Kaninchen aus Ziege	Ziege, pc	-/-/1:50	Dianova	-
Sekundärantikörper für die Westernblot-Analyse				
HRP-gekoppelte anti-Kaninchen aus Ziege	Ziege, pc	1:10000/-/-	Sigma	-

**Tabelle 3: Übersicht über käufliche Sekundärantikörper**

HRP, Horse Raddish Peroxidase; IEM, Immunoelektronenmikroskopie; IMF, Immunfluoreszenz; pc, polyklonal; WB, Western-Blot

## **2.9 Lichtmikroskopischer Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenz**

### **2.9.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Tabakmesophyllprotoplasten**

Die Tabakmesophyllprotoplasten wurden hierzu mit 1 ml W5 Waschlösung versetzt und für 5 min bei 1100 Upm (100xg) zentrifugiert (Sigma 2K15, Rotor Nr. 11411, Sigma Laborzentrifugen). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Protoplasten 60 min bei Raumtemperatur in 3,7 % Paraformaldehyd (PFA, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer (MtsB: 100 mM PIPES pH 6,8; 2 mM Na<sub>2</sub> EGTA; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; Gamborg und Phillips, 1995) für 1 h fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschliessend in 1,5 ml MtsB gewaschen und für 30 min in 0,5 % TritonX 100 in MtsB permeabilisiert. Die sedimentierten Protoplasten wurden auf poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Deckgläsern (22x22 mm, Menzel, Braunschweig) immobilisiert und mit PBS gewaschen. Zur Reduktion freier Aldehydgruppen wurden die Zellen für 15 min in 100 mM Glycin in PBS gewaschen und anschliessend für 30 min in 1 % BSA (Fraktion V, Sigma) in PBS blockiert. Die Inkubation der primären Antiseren erfolgte in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 2) in 1 % BSA in PBS in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Protoplasten 2 mal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären, fluorochrom-gekoppelten Antiserum (siehe Tabelle 3) für 1,5 h im Dunkeln inkubiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Zellkerne für 15 min mit DAPI in PBS (1:5000) gefärbt und die Protoplasten erneut kurz mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit Einbettungsmedium (100 mM Tris/Base pH 8,5; 24 % Glycerol; 9,6 % Mowiol 4-88, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland; 2,5 % 1,4-Diazabizyclo-(2,2,2)-octan (DABCO), Sigma; Johnson et al., 1982; Langanger et al., 1983) eingebettet. Die Aushärtung erfolgte über Nacht im Kühlschrank.

Für den Nachweis von GFP-Fusionsproteinen wurden die Protoplasten wie oben beschrieben fixiert, mit 100 mM Glycin in PBS gewaschen und permeabilisiert. Nach Färbung der Zellkerne wurden die Protoplasten mit Einbettmedium eingedeckelt.

### **2.9.2 Indirekte Immunfluoreszenz an CHO-K1 Zellen**

Für den indirekten Nachweis endogener bzw. heterolog exprimierter Proteine wurden die Zellen auf sogenannten Kammerobjektträgern (Nunc) angezogen. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen in PBS (enthält zusätzlich 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur in 3,7 % Paraformaldehyd in MtsB fixiert. Alternativ wurden die Zellen über Nacht bei 4°C im Kühlschrank fixiert. Anschliessend wurden die Zellen zweimal mit MtsB gewaschen und mit 0,5 % TritonX 100 in MtsB für 15 min permeabilisiert. Zur Reduktion freier Aldehydgruppen wurden die Zellen mit 100 mM Glycin in PBS für 15 min gewaschen. Die Inkubation der entsprechend verdünnten (siehe Tabelle 2) primären Antisera erfolgte nach 30 min Blockieren in 1 % BSA in PBS bei 4 °C über Nacht in Blockierungslösung. Nach zweimaligem, kurzen Waschen in PBS wurde mit dem sekundären, fluorochrom-gekoppelten Antikörper für 1-2 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubiert (siehe Tabelle 3). Um ein vorzeitiges Ausbleichen des Antikörpers zu vermeiden, wurden von diesem Schritt ab alle folgenden Inkubationen in einer verdunkelten Laborkammer durchgeführt. Anschliessend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Kerne wie unter 2.9.1 beschrieben mit DAPI angefärbt. Zur Anfärbung des Aktinzytoskeletts wurden die Zellen zusätzlich mit Phalloidin-FITC in PBS (1:200, Sigma) für 15 min gewaschen. Vor dem Eindeckeln der Objektträger mit Einbettmedium wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen.

Für den Nachweis von GFP-Fusionsproteinen in CHO-K1 Zellen wurden die Zellen nach kurzem Waschen in PBS (enthält zusätzlich 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) für 30 min in 3,7 % PFA in MtsB fixiert. Anschliessend wurden die Zellen permeabilisiert und mit MtsB und 100 mM Glycin in PBS gewaschen. Nach Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen mit Einbettmedium eingedeckelt.

### **2.9.3 Mikroskopische Analyse und digitale Bildverarbeitung**

Die mikroskopische Analyse der Proben erfolgte entweder an einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 630-facher Vergrösserung, oder an einem inversen Leica TCS 4d Laserscanmikroskop



(Leica, Bensheim, Deutschland). Die entsprechenden Bilder wurden direkt digitalisiert und mit Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems, La Jolla, USA) bearbeitet und zusammengesetzt. Am Axiophot-Fluoreszenzmikroskop wurden die Bilder mit einer DP10-Kamera (Olympus, Düsseldorf, Deutschland) digitalisiert. Die digitale Verarbeitung der Primärdaten erfolgte unter Zuhilfenahme von ImageJ 1.22d (NIH, New York, USA) bzw. Imaris 3.02 mit Huygens Erweiterung (Bitplane AG, Zürich, Schweiz).

## **2.10 Proteinextraktion und SDS-Gelelektrophorese**

### **2.10.1 Zellernte und Präparation von Proteinextrakten aus CHO-K1 Zellen**

Zur Herstellung von denaturierten Proteinextrakten aus CHO-K1 Zellen wurden diese in 6-well Platten kultiviert und transfiziert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 2 ml PBS wurde der Überstand entfernt und 150 µl heisser (ca. 90 °C), doppelkonzentrierter SDS Probenpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % SDS; 200 mM DTT; 30 % Glycerol) auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden nach 5 min mit einem Zellschaber von der Oberfläche entfernt, die Zellextrakte in Eppendorfgefässe überführt und für 10 min bei 96 °C denaturiert. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Extrakte wurden bis zur Analyse bei –80 °C gelagert. Von dem Extrakt wurden jeweils 15 µl pro Gelspur aufgetragen, eine Extraktmenge, die etwa 10000 Zellen entspricht.

### **2.10.2 Zellernte und Präparation von Proteinextrakten aus *Tabakmesophyllprotoplasten***

Die Protoplastensuspension wurde zur Sedimentation mit 1 ml Waschlösung versetzt und für 5 min bei 1100 Upm (100xg) zentrifugiert (Sigma 2K15, Rotor Nr. 11411, Sigma Laborzentrifugen). Nachdem Absaugen des Überstands wurden 50 µl doppelkonzentrierter SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Protoplasten für 10 min bei 96 °C lysiert. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte wie unter 2.10.1 beschrieben. Für die Gelelektrophorese und die Western-Analyse wurden jeweils 20 µl Zellextrakt (entspricht etwa 20000 Zellen) benutzt.

### **2.10.3 PAA-Gelelektrophorese und Western-Analyse**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12 bzw. 15 %igen diskontinuierlichen Polyacrylamid SDS-Gelen (Laemmli, 1970). Die SDS-Gele wurden unter Verwendung von Roti-Blot-Transferpuffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben auf Nitrocellulosemembranen (0,45 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) geblottet. Die Membranen wurden für 30 min bei RT in 5 % Magermilchpulver in PBS blockiert und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Membranen in PBS wurden diese mit dem Sekundärantikörper in Blockierungslösung für 60 min bei RT inkubiert. Die Verdünnungen der entsprechenden Antikörper sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem „Enhanced-Chemiluminescence-Detection-System“ (NEN, Boston, USA) nach Herstellerangaben mit Hilfe von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji, Düsseldorf, Deutschland). Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklermaschine (45 Compact, Protec, Oberstenfeld, Deutschland). Zur Digitalisierung der Filme wurde ein Agfa Snapscan 600, (Agfa, Mortsel, Deutschland) benutzt. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, USA). Als Molekulargewichtsstandards für die SDS-Gelelektrophorese wurden folgende Proteinmischungen (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet: PhosphorylaseB, 94 kDa; BSA, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Carbo-Anhydrase, 30 kDa; Trypsin-Inhibitor, 20,1 kDa;  $\alpha$ -Lactalbumin, 14,4 kDa.

## **2.11 Elektronenmikroskopie**

### **2.11.1 Fixierung und Einbettung von Tomatenzellen aus Suspensionskultur für Ultrastrukturanalysen**

Für die Fixierung wurden 0,3 ml einer 48 h zuvor überimpften Tomatensuspensionszellkultur mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 1,5 ml Fixierungslösung überführt. Die Fixierung erfolgte in 1,5 % Glutardialdehyd (GA; Roth) in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 3 h bei Raumtemperatur. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle

weiteren Arbeitsschritte in 2 ml Eppendorfgefäßen bei RT. Nach Entfernen der Fixierungslösung wurden die Zellen zweimal für 15 min mit 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 gewaschen. Die Postfixierung erfolgte mit 1 % OsO<sub>4</sub> in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 für 1 h. Danach wurden die Zellen einmal in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 für 15 min und zweimal in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte über Nacht en bloque in 2 % Uranylacetat in H<sub>2</sub>O. Um die weitere Verarbeitung der Proben zu vereinfachen wurden die Zellen nach dreimaligen Waschen in PBS immobilisiert. Hierzu wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit einem Tropfen 4 %igen Na-Alginat (Merck) in PBS pH 7,4 versetzt. Diese Suspension wurde dann mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in Immobilisierungslösung (100 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS pH 7,4) getropft. Die Zellaggregate wurden anschliessend wieder in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Aceton Reihe (30, 50, 70, 90, 100, 100 %) entwässert. Die Einbettung der Zellaggregate erfolgte abschliessend in Spurr (Plano, Wetzlar, Deutschland). Hierzu wurden die entwässerten Zellen in ein Spurr/Aceton Gemisch im Verhältnis 1:1 überführt, und über Nacht in einem offenem Mikrozentrifugengefäß aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Einbettmedium noch einmal gegen 100 % iges Spurr ausgetauscht und die Proben bei 60 °C in hitzebeständigen Plastikformen (Plano) auspolymerisiert.

### ***2.11.2 Fixierung und Einbettung von Tomatenzellen für Immunogoldmarkierungen***

Hierzu wurde wie schon unter 2.11.1 beschrieben verfahren, jedoch erfolgte die Fixierung in zwei Schritten. Die Vorfixierung erfolgte in 0,25 % GA in 20 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 für 30 min bei 4 °C. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstands erfolgte die Fixierung in einem 3 % PFA/0,25 % GA-Gemisch in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4 gewaschen und wie unter 2.11.1 beschrieben immobilisiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 90 %) bei -10 °C. Anschliessend wurden die Zellaggregate schrittweise in LR-Gold (London Resin Laboratories, London, England) überführt:

- LR-Gold/Ethanol (1+2) 30 min bei -20 °C
- LR-Gold/Ethanol (1+1) 30 min bei -20 °C
- LR-Gold/Ethanol (2+1) 45 min bei -20 °C
- LR-Gold ÜN bei -20 °C

Die Zellaggregate wurden am nächsten Tag für 8 h in LR-Gold mit 0,5 % Dibenzoylperoxid (DBP; Taab Laboratories) bei -20 °C überführt. Die Polymerisation des Harzes erfolgte bei -5 °C über Nacht in Beamcups (Plano).

#### Fixierungslösungen:

Alle Fixierungslösungen wurden vor den Versuchen frisch angesetzt. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Lösungen.

Fixierungsobjekt	Einbettmedium	Fixierungslösung
Tomatenzellen	Spurr	Vorfixierung :1,5 % GA in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,4) Postfixierung: 1 % OsO <sub>4</sub> in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,4)
	LR Gold	Vorfixierung: 0,25 % GA in 20 mM Cacodylatpuffer (pH 7,4) Postfixierung: 3 % PFA/0,25 % GA in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,4)

**Tabelle 4: Übersicht Fixierungslösungen für Tomatenzellen**

GA, Glutardialdehyd; PFA, Paraformaldehyd, OsO<sub>4</sub>, Osmiumtetroxid

#### **2.11.3 Ultramikrotomie und Elektronenmikroskopie**

Die in Spurr bzw. LR-Gold eingebetteten Proben wurden an einem Reichert Ultracut S (Leica) geschnitten. Sowohl für die Ultrastrukturbetrachtungen als auch für die Immunogoldmarkierungen wurden 70-80 nm Schnitte angefertigt und an einem Zeiss EM 902 analysiert. Zur Dokumentation wurden Kodak Filmplatten (Kodak, Stuttgart, Deutschland) belichtet und entwickelt. Die Negative wurden zur weiteren Bearbeitung an einem Agfa Snapscan 600 (Agfa, Mortsel, Deutschland) mit Durchlichtaufsatz digitalisiert und in Adobe Photoshop zusammengestellt und nachbearbeitet.

#### **2.11.4 Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten**

Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden hierzu auf Nickelslotgrids (Plano) aufgenommen und mit der Oberseite nach unten auf sterile Wassertropfen überführt. Alle weiteren Versuchsschritte wurden auf Flüssigkeitstropfen durchgeführt. Hierzu wurde die jeweilige Flüssigkeit mit einer Pipettenspitze unter dem Slotgrid abgesaugt und durch die nächste Lösung ersetzt. Die Grids wurden im folgenden nacheinander für jeweils 15 min mit 100 mM Glycin in PBS, CWF in PBS und 1 % BSA-C (Biomol, Hamburg, Deutschland) in PBS inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 1 % BSA in PBS für 3 h bei 28 °C. Nach 6-maligem, kurzen Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, gold-gekoppelten Antikörper in 1 % BSA in PBS für 1,5 h bei 28 °C. Anschliessend wurden die Grids jeweils 5 mal in PBS und H<sub>2</sub>O gewaschen, und für 10 min mit 1 % Uranylacetat in H<sub>2</sub>O nachkontrastiert.

#### **2.12 Messung der Luciferaseaktivität in CHO-K1 Zellen**

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 500 µl Zellsuspension in 24-Kammer Platten (Nunc) ausgesät und 24 h später mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von etwa 40-50 %. Bei der Transfektion wurden für alle Proben die gleichen DNA- und Transfektionsreagenzmengen verwendet. Der Expressionszeitraum betrug immer 36-40 h. Bevor die Zellen mit 70 µl „Cell Culture Lysis Reagent“ (CCLR: 100 mM Calciumphosphat pH 7,8; 1 mM EDTA; 7 mM 2-Mercaptoethanol; 1 % Triton X-100; 10 % Glycerol) lysiert wurden, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (enthielt 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte für 15 min auf einem Schüttler. Anschliessend wurde der Zellextrakt in Mikrozentrifugengefässe überführt und bis zur Messung bei -85 °C gelagert.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 20 µl des Zellextrakts in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte in einem Mikrolumat (LB 96 P, EG & G Berthold, Bad Wildbad), in dem zu jeder Probe 100 µl Substratlösung (20 mM Tricine pH 7,8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 3,3 mM DTT; 270 µM Coenzyme A; 50 µM Luciferin; 500 µM

ATP) injiziert wurden. Die Registrierung erfolgte nach einer 2-sekündigen Verzögerung über 30 sek. Es wurden jeweils 4 Parallelproben verarbeitet und alle Versuche mindestens 3 mal wiederholt. Die grafische und statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

### **2.13 Hitzestressversuche**

Bei Tomatenzellen aus Suspensionskultur wurde der Hitzestress in einem temperierbaren Schüttel-Wasserbad unter Abschluss von Licht durchgeführt. Die entsprechenden Kontrollzellen befanden sich währenddessen auf einem Rundschüttler bei Raumtemperatur (24 °C). Tabakmesophyllprotoplasten wurden in einem temperierbaren Wasserbad auf die entsprechende Hitzestresstemperatur erwärmt. Die Hitzestressversuche bei CHO-K1 Zellen wurden in einem auf 41 °C erwärmten Zellkulturschrank durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in die folgenden zwei Hauptabschnitte:

- Im ersten Abschnitt steht die Identifizierung der Exportsequenz von HsfA2 und wichtiger Strukturmerkmale für die Interaktion mit HsfA1 im Vordergrund.
- Im zweiten Abschnitt werden einzelne Teilaspekte der komplexen Interaktion von HsfA2 mit niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17-Familie dargestellt.

#### **3.1 *Pflanzliche und tierische Zellsysteme zur transienten, heterologen Proteinexpression***

Da für beide Teile der Arbeit sowohl tierische- als auch pflanzliche Zellen als Expressionssystem verwendet wurden, sollen wichtige Merkmale beider Systeme einleitend kurz gegenübergestellt werden.

- Form, Kultivierung und Aufarbeitung der Zellen  
Tabakmesophyllprotoplasten sind kugelförmig, und ein Grossteil des Zytoplasmas ist mit Chloroplasten gefüllt. Für die lichtmikroskopische Untersuchung müssen die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern fixiert werden. Bedingt durch die Protoplastierung sind die Zellen sehr fragil und osmotisch gestresst.  
CHO-K1 Zellen hingegen wachsen flach und adhärent auf der Oberfläche von Kulturschalen oder Deckgläsern und können direkt für mikroskopische Untersuchungen verwendet werden.
- Interaktion mit endogenen Proteinen  
Bei der Expression von pflanzlichen Proteinen in Tabakzellen besteht immer die Möglichkeit, dass diese mit anderen endogenen Proteinen interagieren. Insbesondere bei der Expression von HsfA2 kann eine Interaktion mit einem endogenen HsfA1 homologen Transkriptionsfaktor nicht ausgeschlossen werden. Eine Interaktion der heterolog exprimierten, pflanzlichen Hsf mit endogenen, tierischen Hsf ist hingegen eher unwahrscheinlich.

### **3.1.1 CHO-K1 Zellen als Modellsystem für die Untersuchung von Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus *L. peruvianum***

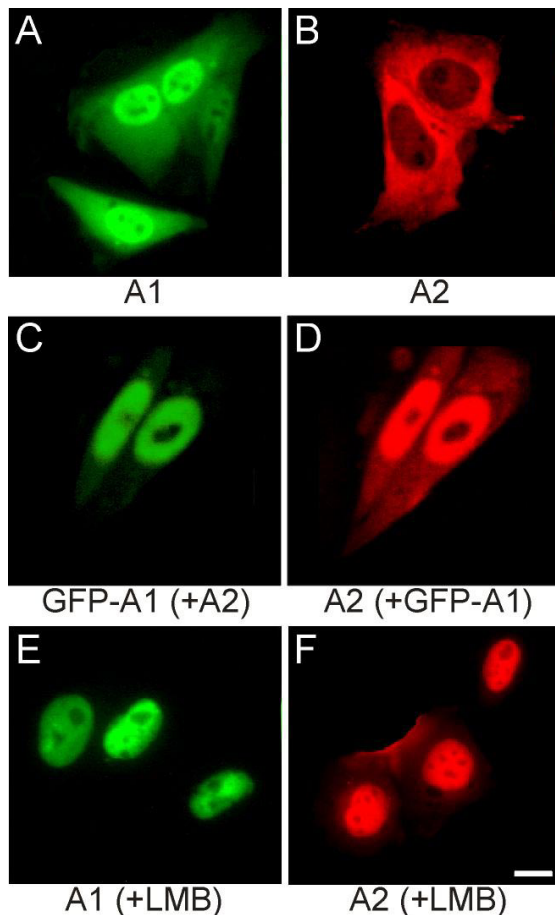
Fast alle bisherigen Untersuchungen an Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus *L. peruvianum* wurden in pflanzlichen Systemen (Scharf et al., 1998a) oder in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Sc; Boscheinen et al., 1997; Bharti et al., 2000; Doering et al., 2000) durchgeführt. Mit der Expression in CHO-K1 Zellen sollten die unter 3.1 beschriebenen Vorteile eines tierischen Expressionssystems genutzt werden. In einem ersten experimentellen Schritt wurde deshalb evaluiert, inwieweit bereits in Tabakprotoplasten gewonnene Ergebnisse unabhängig vom Expressionssystem und der Anwesenheit pflanzenspezifischer Proteine reproduzierbar waren.

Für diesen Versuch wurden CHO-K1 Zellen wie unter 2.7 beschrieben mit HsfA1, GFP-HsfA1 bzw. HsfA2 kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und 20 h bei 37 °C inkubiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen HsfA1 ( $\alpha$ -8HN) bzw. HsfA2 ( $\alpha$ -30HN). Das für die Doppeltransfektion verwendete GFP-HsfA1 Fusionsprotein (Grün Fluoreszierendes Protein) wurde in den fixierten Zellen direkt nachgewiesen.

Wie auch in Tabakprotoplasten (Scharf et al., 1998a) war HsfA1 gleichmässig zwischen Zytoplasma und Zellkern verteilt (Abb. 6A), HsfA2 hingegen befand sich fast ausschliesslich im Zytoplasma (Abb. 6B). Ein ganz anderes Bild ergab sich bei der Koexpression mit GFP-HsfA1, HsfA2 war in diesem Fall überwiegend im Zellkern lokalisiert (Abb. 6C und D). Die Koexpression führte wie auch in Tabakzellen, zu einer Kolokalisation beider Proteine im Zellkern.

Interessanterweise besitzen beide Proteine eine Kernimportsequenz (Lyck et al., 1997), sind jedoch teilweise (HsfA1) bzw. fast vollständig (HsfA2) im Zytoplasma lokalisiert. Bisher wurde dieses Verhalten durch eine intramolekulare Interaktion der HR-A/B Region mit der C-terminalen HR-C Region und der resultierenden Abschirmung der NLS erklärt (siehe auch Abschnitt Diskussion). Der folgende Abschnitt zeigt jedoch, dass dieses Modell modifiziert werden muss.





**Abbildung 6: Lokalisation von HsfA1 und HsfA2 in CHO-K1 Zellen**

CHO-K1 Zellen wurden transient mit den unter den Abbildungen angegebenen, Tomaten-Hsf kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach einer 20-stündigen Expressionsphase wurden die Zellen fixiert und die Proteine immunzytochemisch mit Antikörpern gegen HsfA1( $\alpha$ -8HN) und HsfA2 ( $\alpha$ -30HN) nachgewiesen. In A, C und E (grüner Kanal) ist die Lokalisation von HsfA1 bzw. GFP-HsfA1 dargestellt. In B, D und F ist die Lokalisation von HsfA2 (roter Kanal) gezeigt. Die unter E und F gezeigten Zellen wurden eine Stunde vor der Fixierung mit Leptomycin B (LMB, 2 ng/ml) inkubiert. Der Masstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

### 3.1.2 Identifikation einer Kernexportsequenz in HsfA2

Die zytoplasmatische Lokalisation eines Proteins kann jedoch auch das Resultat eines dominanten Proteinexports sein. Wie für den Import sind auch für den Export von Proteinen bestimmte Signalabschnitte in der Proteinsequenz notwendig und Rezeptoren, die diese erkennen (siehe auch Abschnitt Einleitung). Ein identifizierter Exportrezeptor für Proteine, die eine sog. Kernexportsequenz (NES) besitzen, ist Crm-1 (Exportin-1; Fornerod et al., 1997a, b). Crm-1 lässt sich durch das *Streptomyces* Antibiotikum Leptomycin B (LMB) irreversibel inhibieren (Wolff et al., 1997). Importierte

Proteine, die über einen Crm-1 abhängigen Mechanismus exportiert werden, reichern sich in Folge der LMB-Zugabe im Zellkern an.

Um zu überprüfen, ob HsfA2 bzw. HsfA1 mittels Crm-1 aus dem Zellkern exportiert wird, wurde dem Nährmedium von HsfA2 bzw. HsfA1 exprimierenden Zellen eine Stunde vor der Fixierung LMB (2 ng/ml) zugegeben. Der anschliessende immunologische Nachweis zeigte, dass sich sowohl HsfA1 (Abb. 6E) als auch HsfA2 (Abb. 6F) im Kern der Zellen anreicherte. Beide Proteine benötigen für den Kernexport demnach Crm-1 als Exportrezeptor und sollten ein entsprechendes Exportsignal in ihrer Proteinsequenz besitzen.

Eine genauere Analyse der Proteinsequenz führte zumindest bei HsfA2 zur Identifikation eines leucinreichen Sequenzabschnitts am äussersten C-Terminus, der ein mögliches Exportsignal darstellen könnte. Im Gegensatz hierzu war die Identifikation einer putativen Kernexportsequenz von HsfA1 bisher nicht erfolgreich. So konnte zwar in Versuchen, bei denen C-terminal verkürzte HsfA1-Mutanten in CHO-K1 Zellen exprimiert wurden, gezeigt werden, dass schon die Deletion der letzten 54 AS zur Kernlokalisierung des Proteins führte (nicht gezeigt). Allerdings konnte in diesem Sequenzabschnitt kein leucinreiches Motiv identifiziert werden, was jedoch die Existenz einer NES in diesem Bereich nicht ausschliesst, da Exportsequenzen nur einen geringen Konservierungsgrad aufweisen. Ebenso ist es möglich, dass Crm-1 auch andere „nicht leucinreiche“ Sequenzmotive erkennt.

### **3.1.3 Wichtige Strukturmerkmale für den Import und Export von HsfA2**

Die in vorherigen Abschnitten gezeigten Versuche haben demonstriert, dass CHO-K1 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung von Tomaten-Hsf geeignet sind, und die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2 das Resultat eines dominanten Kernexportprozesses ist.

Mit den folgenden Experimenten sollten wichtige Strukturmerkmale von HsfA2 für den Export und Import und die Interaktion mit HsfA1 genauer verifiziert werden. Hierzu wurden CHO-K1 Zellen wie bereits unter 3.1.1 beschrieben mit verschiedenen HsfA2 kodierenden Plasmiden transfiziert und die Proteine mit einem Antiserum gegen HsfA2 in der indirekten

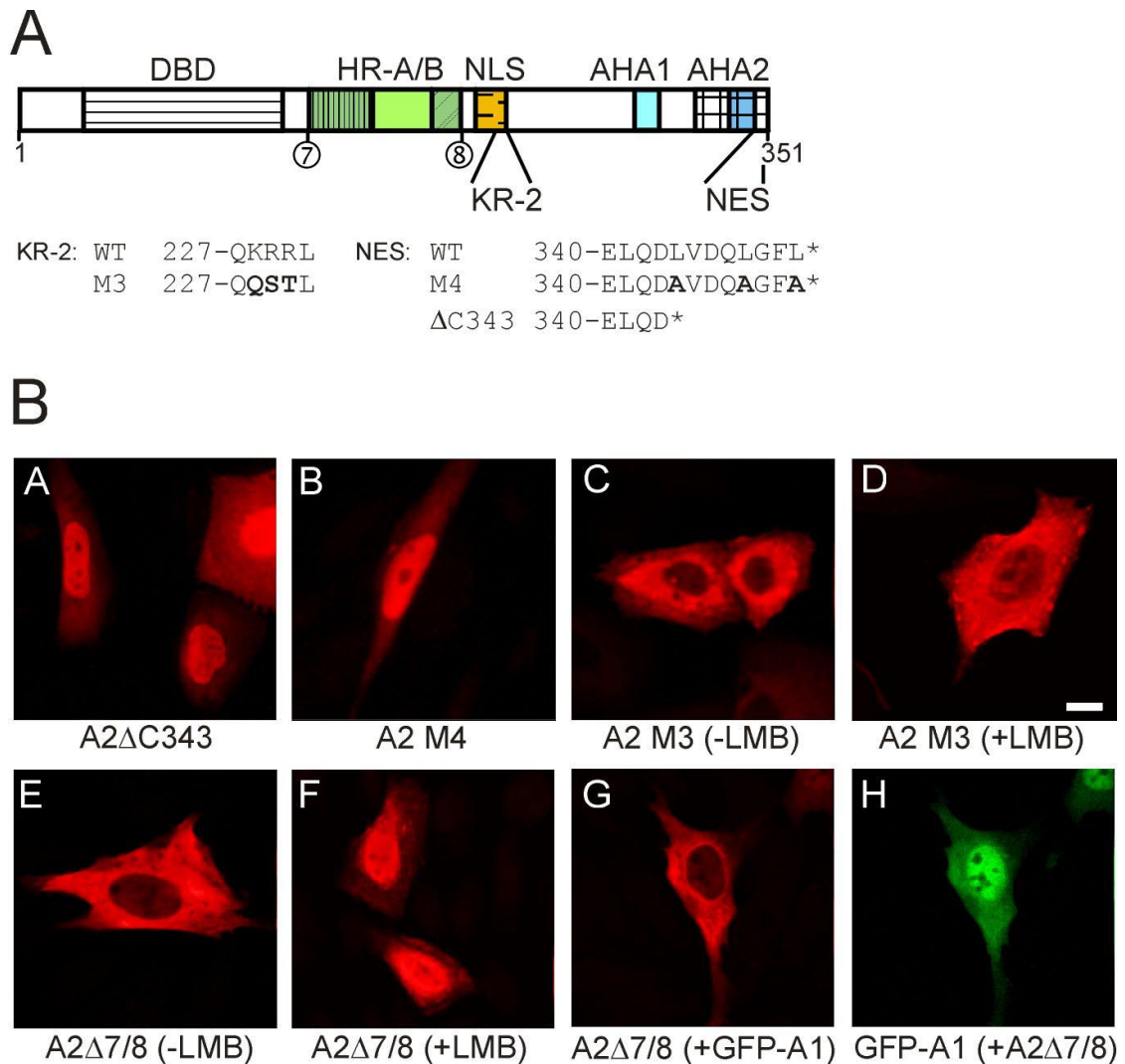
Immunfluoreszenz lokalisiert. Zur besseren Orientierung ist in Abbildung 7 Abbildungsteil A eine Übersicht der untersuchten HsfA2-Mutanten dargestellt.

#### *NES-Mutanten von HsfA2*

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich HsfA2 nach der Zugabe von LMB stark im Zellkern anreicherte. Wie bereits erwähnt (vgl. auch mit Tabelle 1) besitzt HsfA2 eine leucinreiche Sequenz am äussersten C-Terminus (siehe auch Abb. 7 Abbildungsteil A), die ein Exportsignal darstellen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte sowohl die Deletionsmutante HsfA2 $\Delta$ C343 (Abb. 7A), der die letzten 8 AS fehlen, als auch HsfA2M4 (Abb. 7B), eine Mutante bei der die letzten 3 Leucine durch Alanin substituiert wurden, überwiegend im Zellkern nachgewiesen werden. Die Lokalisation dieser Mutanten lässt zwei Schlussfolgerung zu: (i) die NES oder zumindest wesentliche Teile davon sind in den letzten 8 AS enthalten, (ii) das identifizierte Exportsignal gehört zum leucinreichen Typ.

#### *NLS-Mutante von HsfA2*

1997 konnte von Lyck et al. unter anderem die Kernimportsequenz (NLS) von HsfA2 identifiziert werden (Lyck et al., 1997). Hierbei handelt es sich um eine bipartite NLS, die zwischen HR-A/B Region und Aktivatorodomäne liegt. Die NLS-Mutante HsfA2M3 (Lyck et al. 1997, siehe Abb. 7 Abbildungsteil A) war in CHO-K1 Zellen, wie auch das Wildtypprotein, im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Abb. 7C). Aufgrund der Mutation eines Teils der bipartiten Importsequenz (siehe Abb. 10) führte auch die Zugabe von LMB nicht zur Anreicherung des Proteins im Nukleus (Abb. 7D). Selbst eine 5-fach erhöhte LMB-Konzentration von 10 ng/ml führte nicht zur Translokation in den Zellkern (nicht gezeigt). Die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2M3 ist in diesem Fall nicht mehr die Konsequenz eines starken Kernexports, sondern die Folge eines defizitären Imports.



**Abbildung 7: Lokalisation von HsfA2-Mutanten in CHO-K1 Zellen**

Abbildungsteil A: Blockdiagramm von HsfA2 mit wichtigen Strukturelementen für den Import, Export und die Oligomerisierung. Abkürzungen siehe Abb. 1.

Abbildungsteil B: CHO-K1 Zellen wurden transient mit den unter den Abbildungen angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und 20 h später fixiert. Die heterologen Proteine wurden mit einem Antikörper gegen HsfA2 in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. GFP-A1 wurde direkt detektiert. Die unter D und F gezeigten Zellen wurden 1 h vor der Fixierung in LMB-haltigem Medium (2 ng/ml) inkubiert. Der Masstabsbalken entspricht 10 µm.

#### *HR-A/B-Mutante von HsfA2*

Obwohl die Oligomerisierung der Hsf ein integrales Ereignis der stressbedingten Hsf-Aktivierung darstellt, ist sie keine Grundvoraussetzung für den Kernimport (Nover et al., 1997). Punktmutationen bzw. Deletionen der Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region) von Hsf führen deshalb im allgemeinen nicht zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktors, jedoch zu einem Verlust der Regulierbarkeit (Zuo et al., 1994; Boscheinen et al., 1997). In den

Abbildungen 7E-G ist die Lokalisation von HsfA2 $\Delta$ 7/8 dargestellt. Diese Deletionsmutante besitzt alle Strukturelemente des Wildtyps, jedoch keine Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region, gekennzeichnet durch ⑦ und ⑧ in Abb. 7 Abbildungsteil A). Wie auch der HsfA2-Wildtyp war HsfA2 $\Delta$ 7/8 überwiegend im Zytoplasma der CHO-K1 Zellen nachweisbar (Abb. 7E), und die Zugabe von LMB führte zu einer Anreicherung des Proteins im Zellkern (Abb. 7F). Das Fehlen der HR-A/B Region hatte somit keinerlei Einfluss auf das Import- bzw. Exportverhalten von HsfA2. Die Koexpression von HsfA2 $\Delta$ 7/8 mit GFP-HsfA1 (Abb. 7G, H) führte nicht zur Kolo­kalisierung beider Proteine im Zellkern (vgl. mit Abb. 6C und D). HsfA2 $\Delta$ 7/8 blieb ausschliesslich zytoplasmatisch lokalisiert, GFP-HsfA1 hingegen war gleichverteilt zwischen Kern und Zytoplasma nachweisbar. Für die Kolo­kalisierung im Zellkern ist demnach eine HR-A/B-abhängige Interaktion zwischen HsfA1 und A2 unerlässlich, die entweder (i) zum Kotransport beider Proteine in den Zellkern führt (Scharf et al., 1998a), und/oder (ii) die Retention von HsfA2 im Zellkern zur Folge hat.

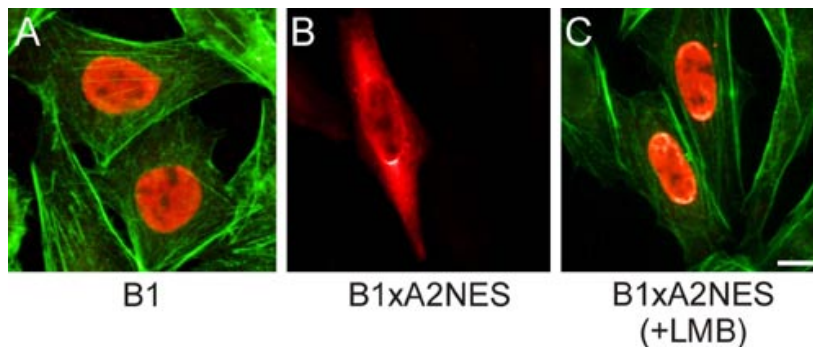
#### **3.1.4 Die Fusion der Kernexportsequenz von HsfA2 an HsfB1 führt zum Export des Fusionsproteins**

Die unter 3.1.3 beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass eine Deletion bzw. Mutation (Negativmutation) der Kernexportsequenz von HsfA2 den Reexport ins Zytoplasma verhinderte und zur Akkumulation des Proteins im Zellkern führte. Um die Funktionalität der NES von HsfA2 auch in einem HsfA2-unabhängigen Kontext zu beweisen, wurden die letzten 22 AS von HsfA2 an HsfB1 aus Tomate fusioniert (vgl. Klonierungsstrategie im Abschnitt Anhang-Plasmidkarten). HsfB1 wurde als Fusionspartner ausgewählt, weil es sich wie in Abbildung 8A zu sehen ist, um ein ausschliesslich im Zellkern lokalisiertes Protein handelt. Um die Zellumrisse besser sichtbar zu machen, wurde das Aktinzytoskelett der in Abbildung 8A und C dargestellten Zellen zusätzlich mit Phalloidin-FITC angefärbt.

Im Gegensatz zum HsfB1-Wildtyp befand sich das HsfB1xHsfA2NES Fusionsprotein fast überwiegend im Zytoplasma der CHO-K1 Zellen (Abb. 8B).

Dieser Kernexport-Effekt war durch die Zugabe von LMB (2 ng/ml) wieder umkehrbar (Abb. 8C).

Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, (i) dass die Fusion der C-terminalen Exportsequenz von HsfA2 zum Export von HsfB1 ins Zytoplasma führte, und (ii) die Sequenz als Exportsignal in einem HsfA2-unabhängigen Kontext funktionell aktiv war.



**Abbildung 8: Lokalisation von HsfB1 und HsfB1xΔ2NES**

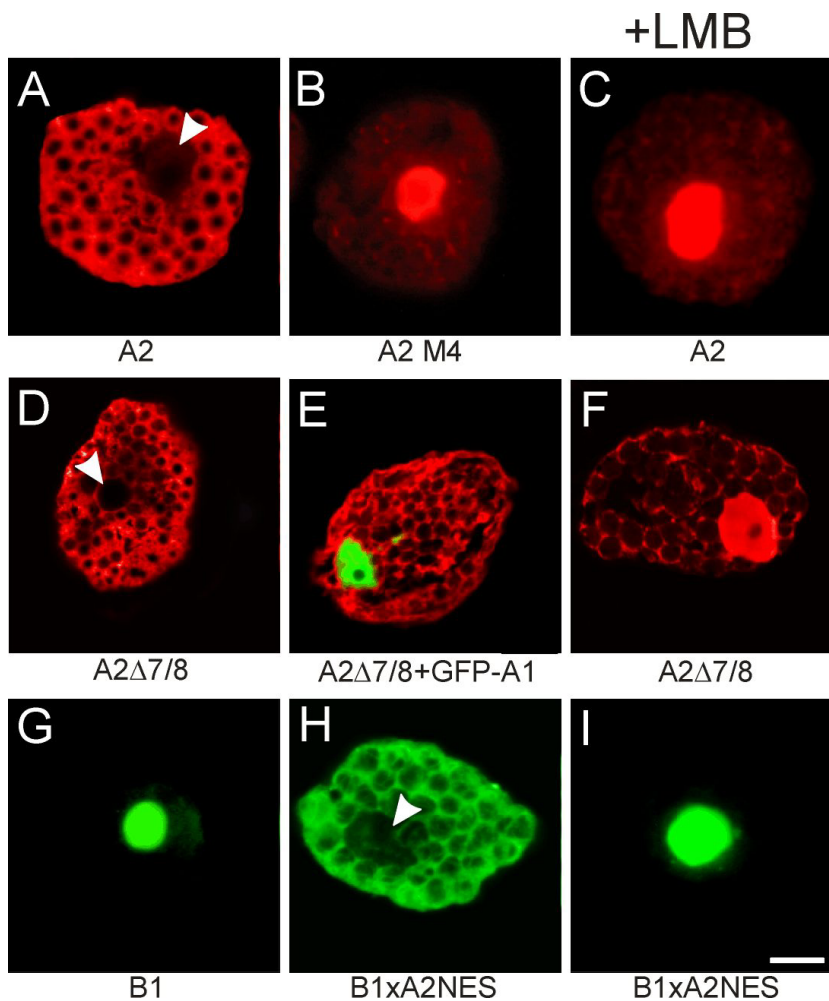
CHO-K1 Zellen wurden transient mit den unter den Abbildungen angegebenen, Tomaten-Hsf kodierenden Plasmiden transfiziert. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen HsfB1. Um die Zellumrisse sichtbar zu machen, wurde das Aktin-Zytoskelett bei A und C zusätzlich mit Phalloidin FITC (grüner Kanal) angefärbt. Die unter C dargestellten Zellen wurden 1 h vor der Fixierung mit Leptomycin B (2 ng/ml) inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

### **3.1.5 *Leptomycin B inhibiert den Kernexport von HsfA2 auch in Tabakmesophyllprotoplasten***

Bei der Untersuchung pflanzlicher Proteine in einem tierischen Expressionssystem, ist es unverzichtbar die Experimente parallel auch in einem pflanzlichen Expressionssystem durchzuführen. Hiermit sollte gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten Transportvorgängen um hochkonservierte, systemunabhängige Mechanismen handelt.

Im nachfolgenden Teil wurden die wichtigsten in CHO-K1 Zellen gewonnenen Erkenntnisse in einem pflanzlichen Expressionssystem überprüft. Hierzu wurden frisch isolierte Tabakmesophyllprotoplasten mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und die exprimierten Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz bzw. der GFP-Autofluoreszenz nachgewiesen. Die Überprüfung der Expression erfolgte zusätzlich noch mittels Western-Blot-Analyse (nicht gezeigt).

Wie bereits 1998 von Scharf et al. gezeigt werden konnte, war HsfA2 überwiegend im Zytoplasma der Tabakprotoplasten lokalisiert (Abb. 9A). Im Gegensatz hierzu, aber im Einklang mit den in CHO-K1 Zellen durchgeführten Versuchen, befand sich die NES-Mutante HsfA2M4 (Abb. 9B) und auch HsfA2 $\Delta$ C343 (nicht gezeigt) ausschliesslich im Zellkern der Tabakzellen. Die einstündige Inkubation in LMB-haltigem Nährmedium (10 ng/ml) führte zur Anreicherung von HsfA2 im Zellkern (Abb. 9C).



**Abbildung 9: Expression und Lokalisation von Tomaten-Hsf in Tabakmesophyllprotoplasten**

Tabakmesophyllprotoplasten wurden wie unter 2.5 beschrieben isoliert und mit den unter den Einzelabbildungen angezeigten Expressionsplasmiden transfiziert. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden Antikörper gegen HsfA2 (A-F) bzw. gegen HsfB1 (G-I) verwendet. GFP-HsfA1 (E) wurde direkt nachgewiesen. Die unter C, F und I gezeigten Protoplasten wurden 1 h vor der Fixierung zusätzlich mit Leptomycin B (10 ng/ml) behandelt. Die Pfeilspitzen in A, D und H zeigen die Lage des Zellkerns an. Der Massstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

Demzufolge ist auch in Pflanzenzellen der Export von HsfA2 von einem Crm-1 homologen Protein abhängig, welches durch LMB inhibiert werden kann. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Haasen et al. (1999), die ein Crm-1 homologes Protein in *Arabidopsis thaliana* (AtXPO1) identifiziert haben und ebenfalls die Wirkung von LMB in Tabakzellen demonstrieren konnten.

Wie auch in CHO-K1 Zellen war HsfA2 $\Delta$ 7/8 in Tabakzellen streng zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 9D) und reicherte sich nach LMB-Zugabe im Zellkern an (Abb. 9F). Es war jedoch nicht mehr in der Lage mit GFP-HsfA1 zu interagieren (Abb. 9E), was bedeutet, dass es entweder nicht mehr zum Kotransport kam und/oder die HsfA1-vermittelte Retention im Zellkern ausblieb.

Zur Überprüfung der Funktionalität der NES von HsfA2 im pflanzlichen Expressionssystem, wurden die Protoplasten, wie im Abschnitt 3.1.4 beschrieben, mit HsfB1 bzw. HsfB1xA2NES kodierenden Plasmiden transfiziert. Auch hier war HsfB1 ausschliesslich im Kern der Zellen lokalisiert (Abb. 9G). Die Fusion von HsfB1 mit der NES von HsfA2 führte zum Export des Fusionsproteins ins Zytoplasma (Abb. 9H), und dieser Effekt wurde durch die Zugabe von LMB wieder umgekehrt (Abb. 9I).

### **3.1.6 Hitzestress führt in CHO-K1 Zellen zur zytoplasmatischen Retention von HsfA2**

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Verteilung von HsfA2 durch den NES-vermittelten Export aus dem Zellkern dominiert wird. Sowohl in Tomatenzellen (Scharf et al. 1998a; Bharti et al., 2000) als auch in Tabakprotoplasten (Scharf et al., 1998a) reichert sich HsfA2 unter Hitzestress in zytoplasmatischen Hitzestressgranula (siehe auch 3.2.1) an. Die zentrale Frage ist demnach der Grund für die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2 unter Hitzestress. Mögliche Ursache hierfür könnte eine generelle Beeinflussung der Import- und Exportvorgänge durch den Hitzestress sein. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Maskierung der Importsequenz, die zur zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins führt. Diese kann entweder durch eine intramolekulare Konformationsänderung

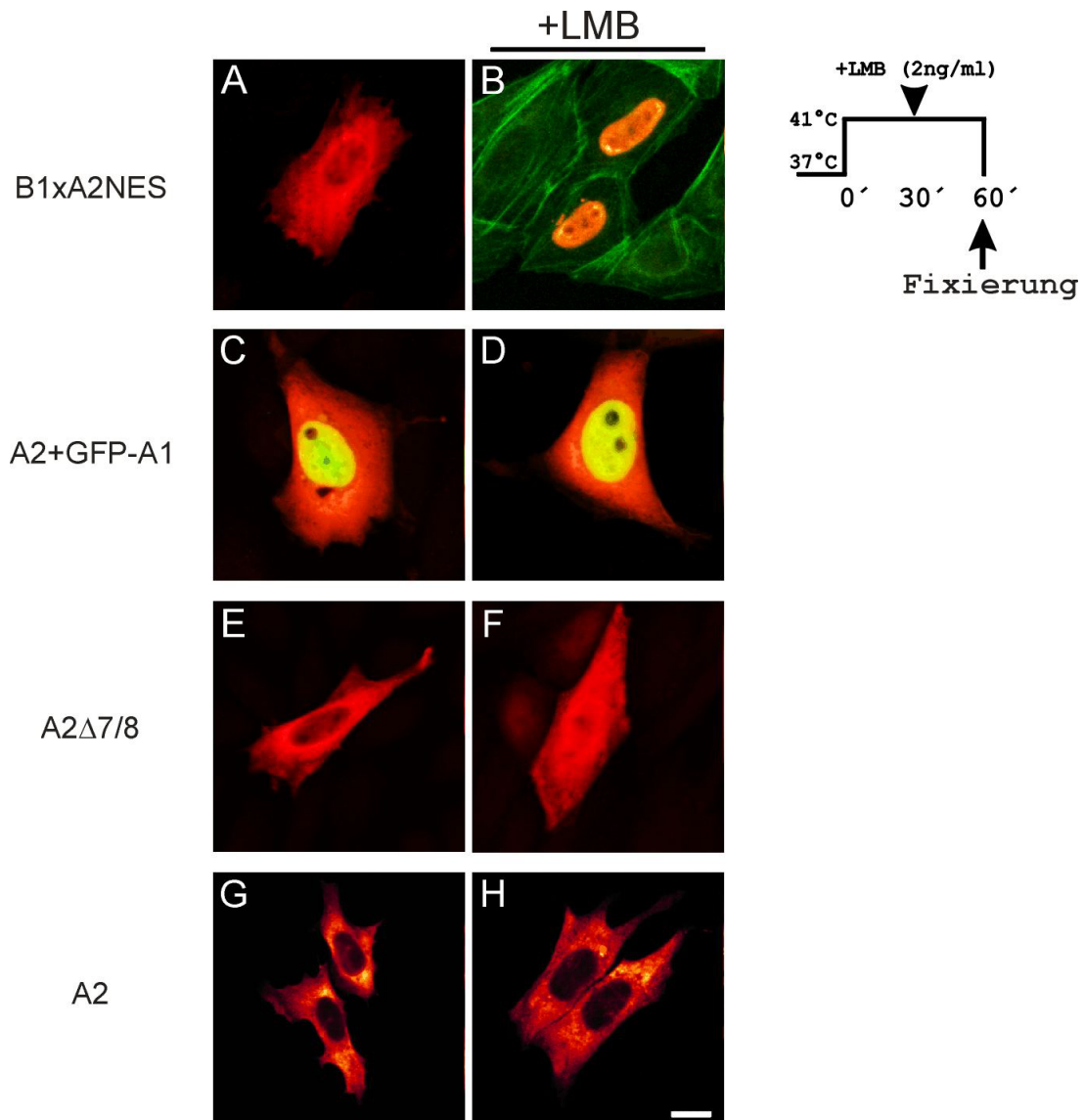


(„shielding“), durch eine Oligomerisierung (Homo- bzw. Heteroligomerisierung) oder durch die Interaktion mit anderen Proteinen entstehen.

Zur Überprüfung der ersten Möglichkeit und als interne Versuchskontrolle, wurden CHO-K1 Zellen mit HsfB1xA2NES kodierenden Plasmiden transfiziert und die Zellen nach einer 24-stündigen Expressionsphase für eine Stunde bei 41 °C einem milden Hitzestress ausgesetzt. Diese Temperatur entspricht in etwa der von Hitzestressversuchen bei Tomatenzellkulturen (Scharf et al., 1998a). Zudem haben Vorversuche gezeigt, dass Hitzestress bei 43 °C in Kombination mit LMB toxisch wirkt. 30 min nach Beginn des Hitzestresses wurde Leptomycin B dem Nährmedium jeweils einer der Doppelproben zugegeben. Hierbei war zu erkennen, dass das Protein auch unter Hitzestress überwiegend im Zytoplasma der Zellen lokalisiert war (Abb. 10A) und LMB wie unter Kontrollbedingungen (vgl. mit Abb. 8C) zu einer Akkumulation von HsfB1xA2NES im Zellkern führte (Abb. 10B). Der milde Hitzestress beeinflusste demnach weder den Protein-Import/Export noch die Wirkung von LMB auf den Exportrezeptor Crm-1.

Um die Möglichkeit der hitzestressbedingten Konformationsänderung von HsfA2 als Grund für die zytoplasmatische Lokalisation zu untersuchen, wurden CHO-K1 Zellen mit HsfA2, HsfA2 $\Delta$ 7/8, bzw. zusammen mit GFP-HsfA1 kodierenden Plasmiden transfiziert und die Proteine immunologisch nachgewiesen. Zellen, die sowohl HsfA2 als auch GFP-HsfA1 exprimierten (Abb. 10C, D) unterschieden sich nicht von Kontrollzellen (vgl. mit Abb. 6C, D). Auch die LMB-Zugabe führte hier nicht zu einer veränderten Lokalisation der beiden Proteine. HsfA2 (roter Kanal) war weiterhin teilweise im Zytoplasma und bei Koexpression mit GFP-HsfA1 (grüner Kanal) grösstenteils im Zellkern kolokalisiert (gelb). Auch die Lokalisation von HsfA2 $\Delta$ 7/8 unterschied sich nicht von der in ungestressten Zellen (Abb. 10E, F). Umso überraschender war, dass die Zugabe von LMB unter Hitzestressbedingungen nicht zu einer Anreicherung des HsfA2-Wildtyps im Zellkern führte (Abb. 10G, H). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch eine hitzestressbedingte Konformationsänderung die Kernimportsequenz von HsfA2 unzugänglich wird, wobei das Vorhandensein der HR-A/B Region eine entscheidende Rolle spielt („shielding“). Denn im Gegensatz zum

HsfA2-Wildtyp gelangte HsfA2 $\Delta$ 7/8, dem die für die Oligomerisierung notwendige HR-A/B Region fehlt, auch unter Hitzestress in den Kern

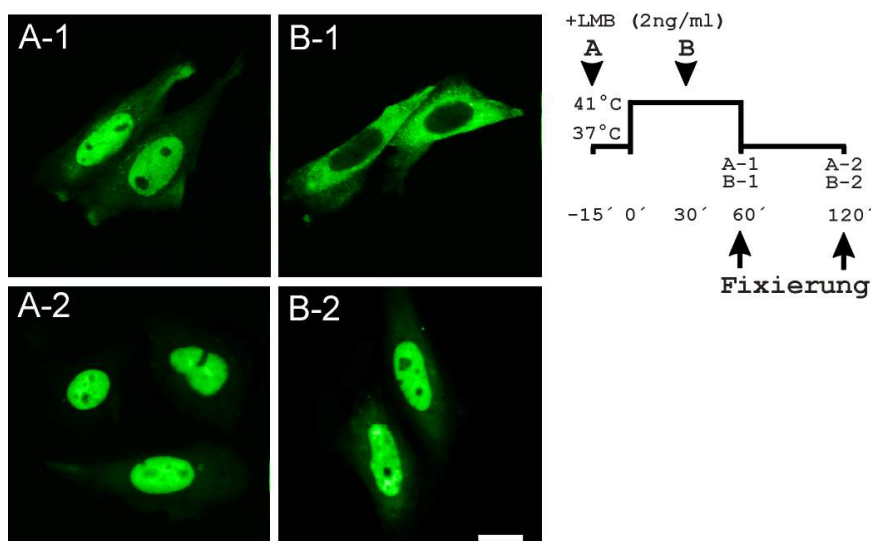


**Abbildung 10: Einfluss von Hitzestress auf die Lokalisation von transient exprimierten Tomaten-Hsf in CHO-K1 Zellen**

CHO-K1 Zellen wurden mit den unter den Abbildungen angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und die Proteine für 20 h exprimiert. Für den insgesamt einstündigen Hitzestress wurden die Zellen in einen 41 °C warmen Inkubator transferiert. Nach 30 min wurde LMB (2 ng/ml) bei den gekennzeichneten Proben (B, D, F, H) dem Nährmedium zugegeben und die Zellen weitere 30 min bei 41 °C inkubiert (siehe Piktogramm). Die Zellen wurden anschliessend fixiert und die Proteine mit den entsprechenden Antisera immunologisch nachgewiesen. Der Masstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

### 3.1.7 Die hitzestressbedingte Retention von HsfA2 im Zytoplasma ist reversibel

HsfA2 gelangte im Gegensatz zu HsfA2 $\Delta$ 7/8 unter Hitzestress nicht mehr in den Zellkern. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen reversiblen Effekt handelte, wurden CHO-K1 Zellen mit GFP-HsfA2 kodierenden Plasmiden transfiziert und die Proteine 20 h lang exprimiert. Leptomycin B wurde entweder 15 min vor (A) bzw. 30 min nach (B) Beginn des Hitzestresses dem Nährmedium zugegeben. Die Fixierung der Zellen erfolgte direkt nach dem einstündigen Hitzestress bzw. nach einer einstündigen Recovery-Periode bei 37 °C (siehe Piktogramm in Abb.11).



**Abbildung 11: Hitzestressexperimente mit GFP-HsfA2**

CHO-K1 Zellen wurden mit GFP-HsfA2 kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und 20 h später entweder 15 min vor (A) oder 30 min nach (B) Beginn des Hitzestresses mit LMB (2 ng/ml) behandelt. Die Fixierung der Zellen erfolgte direkt nach dem Hitzestress (A-1 und A-2) oder nach einer Stunde Recovery bei 37 °C (A-2, B-2). Der Masstabsbalken entspricht 10 µm.

Die Zellen, bei denen Leptomycin B schon 15 min vor dem Hitzestress hinzugegeben wurde, dienten als interne Versuchskontrolle. Bei den so behandelten Zellen (Abb. 11A-1 und 11A-2) akkumulierte HsfA2 vollständig im Zellkern. Hierbei war das Protein bereits direkt nach dem Hitzestress vollständig im Kern nachweisbar. Wurde das Antibiotikum aber erst 30 min nach Beginn des Hitzestresses zu den Zellen gegeben, verblieb HsfA2 im Zytoplasma (Abb. 11B-1). Hierbei scheint der N-terminale „GFP-Tag“ keinen

Einfluss auf das Lokalisationsverhalten von HsfA2 zu haben. Nach der 60-minütigen Recovery-Periode in leptomycinhaltigem Medium war HsfA2 allerdings auch bei diesen Zellen vollständig im Zellkern nachweisbar (Abb. 11B-2).

Falls die zytoplasmatische Lokalisation durch eine konformationsbedingte Hemmung des Kernimports verursacht wird, so ist dieser Effekt reversibel. Mit weiteren Versuchen, in denen die Zellen nach bereits 15 min Recovery fixiert wurden, konnte gezeigt werden, dass HsfA2 zu diesem Zeitpunkt bereits gleichverteilt zwischen Kern und Zytoplasma vorlag (nicht gezeigt).

### ***3.1.8 Für die Translokation von HsfA2 in den Zellkern sind keine intakten Mikrotubuli erforderlich***

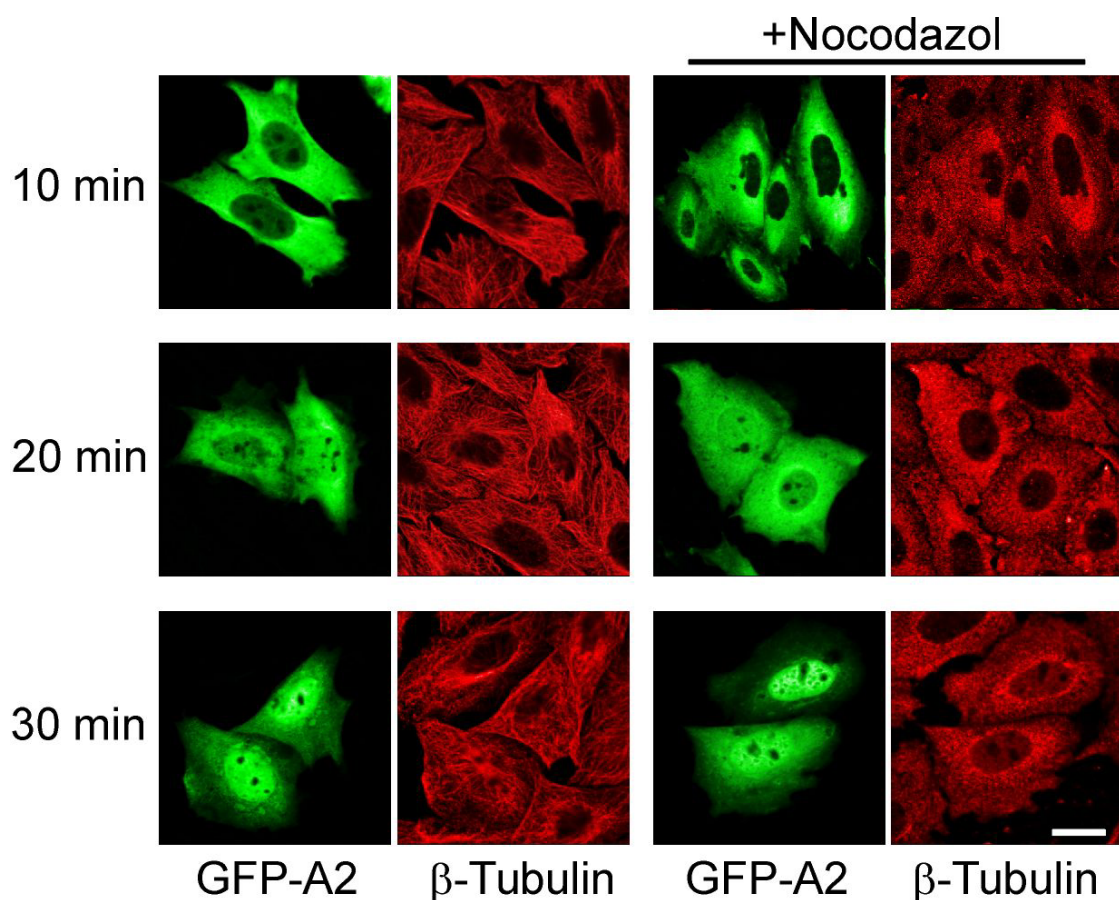
Giannakakou et al. (2000) konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor p53 über Mikrotubuli in den Zellkern transportiert wird und dass der Transport von der Anwesenheit des Motorproteins Dynein abhängig ist. Diese Ergebnisse sind bisher die ersten guten Hinweise, dass nicht nur membranumschlossene Vesikel, wie beispielsweise beim axonalen Transport in Nervenzellen, sondern auch Proteine über Mikrotubuli transportiert werden (siehe auch Abschnitt Diskussion).

Um zu untersuchen, ob auch der Import von HsfA2 von intakten Mikrotubuli abhängig ist, wurden CHO-K1 Zellen mit GFP-HsfA2 kodierenden Plasmiden transfiziert, die Mikrotubuli mit dem Alkaloid Nocodazol zerstört und anschliessend überprüft, ob sich HsfA2 unter dem Einfluss von Leptomycin noch im Zellkern anreichern konnte. Das Nocodazol (25  $\mu$ M) wurde bereits 1 h vor der LMB-Zugabe zu den gekennzeichneten Proben ins Nährmedium gegeben. GFP-HsfA2 wurde direkt nachgewiesen, die Mikrotubuli indirekt über den immunologischen Nachweis von  $\beta$ -Tubulin.

Da aus vorhergehenden Versuchen bekannt war, dass sich HsfA2 bereits 30 min nach der LMB-Zugabe fast vollständig im Zellkern anreicherte, wurden nur Proben 10, 20 bzw. 30 min nach der Leptomycin-Zugabe untersucht. Während in unbehandelten Zellen das Mikrotubulizytoskelett deutlich sichtbar war (linke Hälfte in Abb. 12), waren in den mit Nocodazol behandelten Zellen (rechte Hälfte in Abb. 12) keine intakten Mikrotubuli mehr zu erkennen. Die Ergebnisse zeigten jedoch auch sehr deutlich, dass die Zerstörung der

Mikrotubuli durch Nocodazol scheinbar keine Auswirkungen auf die Translokationsdynamik von GFP-HsfA2 hatte.

Beim Vergleich der einzelnen Zeitpunkte konnte kein merklicher Unterschied beobachtet werden. Auch in den mit Nocodazol behandelten Zellen fand nach 20 min eine Gleichverteilung von GFP-HsfA2 zwischen Kern und Zytoplasma statt, und bereits 10 min später war das Protein in allen Zellen überwiegend im Zellkern angereichert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Translokation von HsfA2 nicht wie bei p53 von intakten Mikrotubuli abhängig ist.



**Abbildung 12: Einfluss von Nocodazol auf den Import von GFP-HsfA2 in den Zellkern**

CHO-K1 Zellen wurden mit GFP-HsfA2 kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert. Vor der Fixierung wurde zu allen Proben LMB (2 ng/ml) für 10, 20 bzw. 30 min dem Kulturmedium zugegeben. Den Zellen, die auf der rechten Hälfte der Bildtafel dargestellt sind, wurde eine Stunde vor Beginn der LMB-Zugabe noch zusätzlich Nocodazol (25  $\mu$ M) in das Nährmedium pipettiert. Die Detektion von  $\beta$ -Tubulin (roter Kanal) erfolgte mit einem monoklonalem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin. GFP-A2 wurde direkt detektiert. Der Masstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

### **3.1.9 Luciferasereporterassays in CHO-K1 Zellen**

Wenn die intrazelluläre Verteilung von HsfA2 so nachhaltig durch die Beeinflussung von Kernimport und -export verändert werden kann, stellt sich die Frage, ob diese Veränderung auch messbare Auswirkungen auf die Transaktivierungsaktivität hat. Um diesen Zusammenhang zwischen Lokalisation und Aktivität näher zu untersuchen, wurden Tomaten-Hsf zusammen mit einem Hsf-abhängigen Luciferasereporterkonstrukt in CHO-K1 Zellen exprimiert. Die Besonderheit des Systems lag in der Promotorwahl des Reporterkonstrukts, was im folgenden näher beschrieben wird.

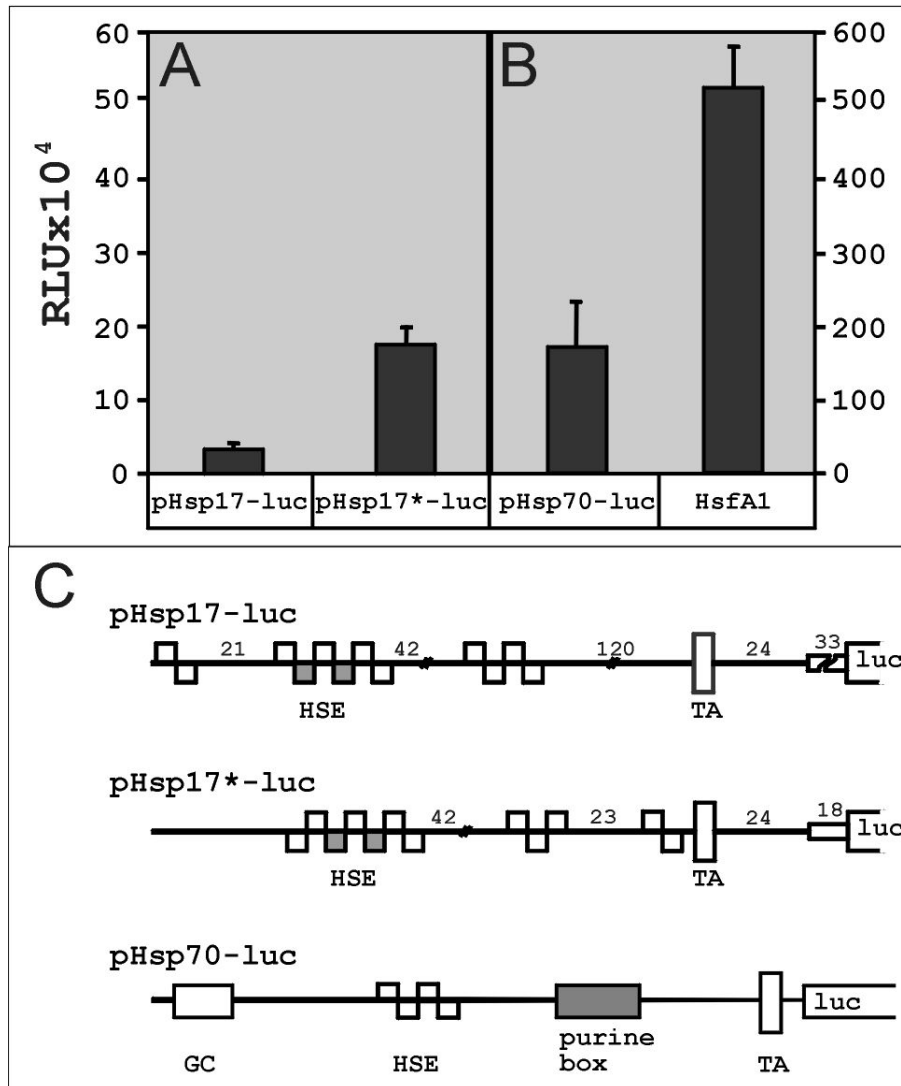
### **3.1.10 Wahl eines geeigneten Promotors**

In einem Vorversuch wurde die Basalaktivität von drei verschiedenen Luciferasereporterkonstrukten in CHO-K1 Zellen untersucht, die sich nur durch ihren Promotor unterschieden. Ziel war es, einen Promotor für die weiteren Versuche zu finden, der neben einer geringen Basalaktivität eine gute Induzierbarkeit durch die Tomaten-Hsf aufwies.

Hierzu wurden zwei verschiedene pflanzliche Promotorfragmente aus dem Hsp17.3B Gen der Sojabohne (*Glycine max*, Gm; Schöffel et al., 1989; Treuter et al., 1993) und ein Hsf-abhängiger Promotor aus dem humanen Hsp70 Gen (Williams et al., 1989) miteinander verglichen. Die pflanzlichen Promotorfragmente wurden hierzu in die MCS (Multiple cloning site, engl. Multiple Klonierungsstelle) des pGL3-basic Vektors (Promega) vor die Firefly-Luciferase (*luc*, *Photinus pyralis*) eingefügt (vgl. Details im Kapitel Anhang-Plasmidkarten).

Für den Luciferaseassay wurden CHO-K1 Zellen wie unter 2.12 beschrieben in 24-Kammer Platten kultiviert und mit den entsprechenden Reporterplasmiden transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 36 h später bestimmt. In Abbildung 13A und B ist die Basalaktivität der 3 verschiedenen Reporterkonstrukte dargestellt, wobei die Luciferaseaktivität auf der y-Achse in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben ist. Der Aufbau der einzelnen Promotoren ist in Abbildung 13 Abbildungsteil C schematisch skizziert.

Die Basalaktivität der beiden pflanzlichen Promotoren war sehr gering, und ihre Induzierbarkeit extrem hoch. Im Gegensatz hierzu war die Basalaktivität des humanen Hsp70-Promotors sehr hoch und die Induzierbarkeit sehr gering.



**Abbildung 13: Vergleich der Basalaktivität von drei Luciferasereporter-konstrukten in CHO-K1 Zellen**

CHO-K1 Zellen wurden mit den in der Grafik dargestellten Reporterkonstrukten transient transfiziert und die Luciferaseaktivität 36 h nach der Transfektion gemessen. Die Aktivität ist in RLU auf der y-Achse dargestellt, wobei diese im Abbildungsteil B um den Faktor 10 erhöht ist. Während für die pflanzlichen Promotoren aus der Sojabohne (pHsp17-luc, pHsp17\*-luc) in Abbildungsteil A nur die Basalaktivität dargestellt ist, ist im Abbildungsteil B neben der Basalaktivität von pHsp70-luc zusätzlich das Aktivierungspotential von HsfA1 dargestellt. In Abbildungsteil C sind die Strukturelemente der verwendeten Promotoren skizzenhaft abgebildet.

RLU, relative Lichteinheiten; HSE, Hitzestresselement; TA, TATA-Box; luc, Luciferase; GC, GC-Box. Die Zahlen in den Skizzen geben die Abstände der Promotorelemente in Nukleotiden zueinander an. Schattierte Bereiche in den HSE entsprechen mutierten, nichtfunktionellen Bereichen.

In Gegenwart von HsfA1 war nur eine 2-3-fache Steigerung der Aktivität zu beobachten (siehe Abb 13B). Hierfür verantwortlich ist höchstwahrscheinlich der sehr komplexe Aufbau des Promotors und die Transaktivierung durch endogene Transkriptionsfaktoren. Für alle weiteren Versuche wurde das pHsp17-luc Konstrukt verwendet, weil es im Vergleich zu pHsp17\*-luc eine noch geringere Basalaktivität hatte und zudem eine sehr gute Induzierbarkeit durch Tomaten-Hsf besass, was nachfolgend gezeigt wird.

### ***3.1.11 Das Transaktivierungspotential von HsfA2 ist stark von dessen Lokalisation abhängig***

Wie bereits unter 3.1.9 erwähnt sollte sich die intrazelluläre Verteilung von HsfA2 auch in seinem Transaktivierungspotential widerspiegeln. Um dies zu untersuchen, wurden CHO-K1 Zellen mit dem unter 3.1.10 beschriebenen pHsp17-luc Reporter und den unter der Abbildung 14 angezeigten Hsf kodierenden Plasmiden transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde nach einer 36-stündigen Expressionsphase bestimmt.

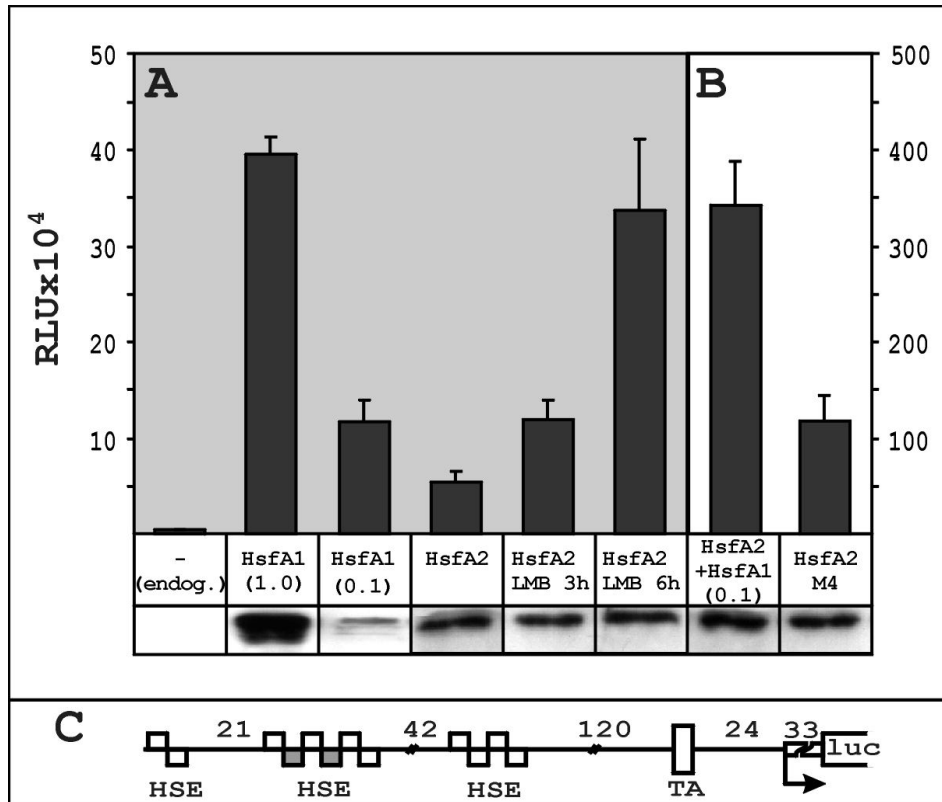
Im Gegensatz zum überwiegend im Zytoplasma lokalisierten HsfA2 (vgl. Abb. 6B) war das Transaktivierungspotential von HsfA1, der gleichverteilt zwischen Kern und Zytoplasma (vgl. Abb. 6A) in der Zelle vorlag, wesentlich höher. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität von HsfA1 stark von der eingesetzten Plasmidmenge abhängig war (vgl. HsfA1 (1,0) mit HsfA1 (0,1) in Abb. 14A).

Interessant war, dass die LMB-bedingte Akkumulation von HsfA2 im Zellkern bereits 3 h nach der Zugabe zur Verdoppelung der Aktivität, 6 h nach Zugabe sogar zu einer 6,5-fachen Aktivitätssteigerung führte. Die Expression der Kernexportmutante HsfA2M4, die ausschliesslich im Zellkern lokalisiert war (vgl. Abb. 7F), bewirkte folglich auch eine 20-fach höhere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 14B).

Scharf et al. konnten schon 1998 zeigen, dass die Koexpression von HsfA1 und HsfA2 in Tabakzellen nicht nur zur Koloalisation beider Proteine im Zellkern führte, sondern unter Hitzestress auch zu einer synergistischen Transaktivierung des Reporterenzym Glucoronidase (GUS, Scharf et al., 1998a). Da es sich bei der Luciferase um ein sehr temperatursensitives Enzym handelt, das ab 42 °C denaturiert, wurden die Versuche in CHO-K1



Zellen nur unter Kontrollbedingungen bei 37°C durchgeführt. Die oben beschriebene synergistische Steigerung der Aktivität von HsfA2 konnte auch in CHO-K1 Zellen gemessen werden. Um diesen Effekt zu beobachten, reichte schon ein Zehntel der Plasmidmenge an HsfA1 aus (Abb. 13A).



**Abbildung 14: Luciferasereporterassay in CHO-K1 Zellen**

CHO-K1 Zellen wurden mit dem pHsp17-luc Reporterkonstrukt (Abbildungsteil C), und den unter A und B angegebenen Tomaten-Hsf transfiziert. Nach einer 36-stündigen Expressionsphase wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Expression der kotransfizierten Hsf wurde mittels Westernanalyse überprüft (Abbildungsteil A und B unten). Es ist zu beachten, dass die Skala der y-Achse im Abbildungsteil B um den Faktor 10 vergrößert ist. Die Abkürzungen des skizzenhaft dargestellten pHsp17-luc Reporters sind in Abb. 13 erläutert.

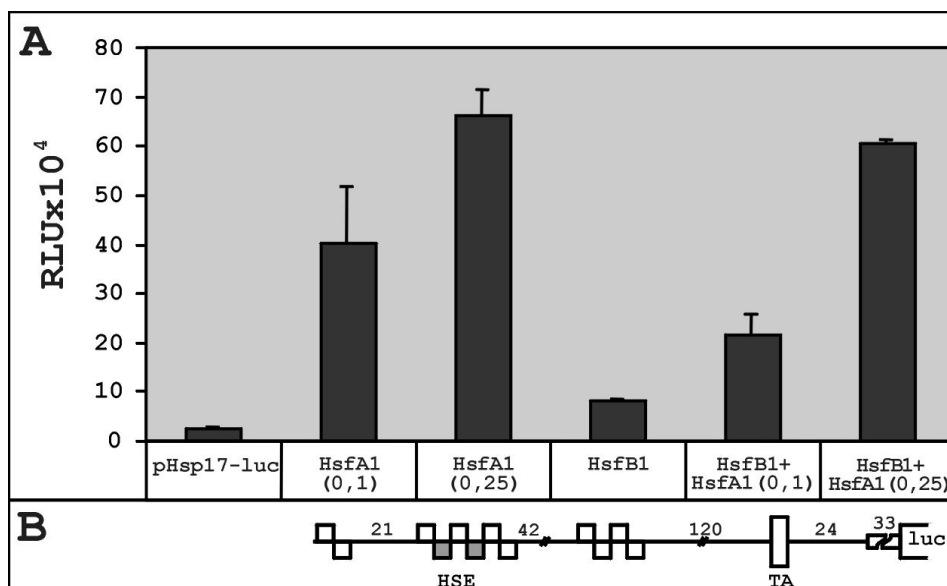
### **3.1.12 HsfB1 kann in CHO-K1 Zellen nicht durch Kotransfektion mit HsfA1 synergistisch transaktiviert werden**

Aus Versuchen in Tabakprotoplasten war bekannt, dass auch die Aktivität von HsfB1 durch Zugabe von HsfA1 synergistisch gesteigert werden kann (K. Bharti und P. Doering aus dem AK Nover, unveröffentlichte Daten). Bereits relativ geringe Mengen von HsfA1 reichen aus, um die Aktivität von HsfB1

synergistisch zu steigern. Dieser Synergismus tritt sowohl unter Kontroll- als auch unter Hitzestressbedingungen auf.

Interessanterweise konnte dieser Effekt jedoch bei der Expression in der Bäckerhefe bisher nicht beobachtet werden (Bharti aus dem AK Nover, unveröffentlichte Daten). Es bot sich daher an, auch die Möglichkeit der Expression in CHO-K1 Zellen zu nutzen, um diesen Effekt in einem weiteren heterologen System zu überprüfen. Hierzu wurden die Zellen wie schon unter 3.1.1 beschrieben mit pHsp17-luc, HsfB1 und verschiedenen Konzentrationen von HsfA1 transfiziert und die Aktivität der Luciferase nach 36-stündiger Expression bestimmt.

Wie in Abb. 15A zu sehen ist, war die Transaktivierung durch HsfB1 sehr gering, obwohl HsfB1 ein rein nukleäres Protein ist (siehe Abb. 8A). Der Effekt von HsfA1 hingegen war, wie auch schon unter 3.1.1 gezeigt, stark von der Menge der eingesetzten DNA abhängig. Die Kotransfektion von HsfB1 mit HsfA1 führte allerdings, wie auch im Hefesystem gezeigt, nicht zu einer synergistisch gesteigerten Aktivität.



**Abbildung 15: Luciferasereporterassay mit HsfA1 und HsfB1**

CHO-K1 Zellen wurden mit den angegebenen Reporter- und Aktivatorkonstrukten transfiziert und 36h nach der Transfektion die Luciferaseaktivität bestimmt. Im Abbildungsteil A ist die Luciferaseaktivität in RLU auf der y-Achse angegeben. Abbildungsteil B zeigt skizzenhaft den Aufbau des verwendeten pHsp17-luc Reporters. Die Abkürzungen des dargestellten pHsp17-luc Reporters sind in Abb. 13 erläutert.

Anzumerken ist, dass in allen Systemen Reporterkonstrukte mit identischen pHsp17-Promotoren verwendet wurden, so dass sich die Unterschiede nur mit der Erfordernis pflanzenspezifischer Kofaktoren erklären lassen, die weder in Hefezellen, noch in CHO-K1 Zellen vorhanden sind. Zur genaueren Klärung der Ursachen sind jedoch weitere Experimente erforderlich, insbesondere um die vermuteten pflanzenspezifischen Kofaktoren zu identifizieren.

### **3.1.13 Ein autofluoreszenter „Tag“ beeinflusst die Transkriptionsaktivität von HsfA2**

In den letzten Jahren hat sich die Verwendung von autofluoreszenten Proteinen als Fusionspartner bzw. „Tags“ in der Zellbiologie für die *in vivo* Beobachtung zunehmend etabliert (Übersicht in Sullivan und Kay, 1999). Im Gegensatz zu den üblichen kurzen „Peptidtags“ handelt es sich bei GFP und CFP (Cyan Fluoreszierendes Protein) bzw. DsRed (Ds, *Discosoma spec.*) um Proteine mit einer Grösse von etwa 30 kDa, die damit oft nur unwesentlich kleiner sind als ihre Fusionspartner.

Um die Auswirkungen verschiedener N- bzw. C-terminaler autofluoreszenter „Proteintags“ auf die Transaktivierungsaktivität von HsfA2 aus Tomate näher zu untersuchen, wurden CHO-K1 Zellen mit pHsp17-luc und entsprechenden autofluoreszenten HsfA2-Aktivatoronstrukten transfiziert. Nach einer 30-stündigen Expressionsphase wurde zu den entsprechend gekennzeichneten Proben LMB (2 ng/ml) in das Kulturmedium gegeben. Die Luciferaseaktivität aller Proben wurde nach Ablauf der 6-stündigen Inkubationsphase bestimmt. Parallel hierzu wurden die Proteine lichtmikroskopisch in CHO-K1 Zellen nachgewiesen, wobei diese Ergebnisse aus Übersichtsgründen in Abbildung 16 Abbildungsteil B tabellarisch zusammengefasst sind.

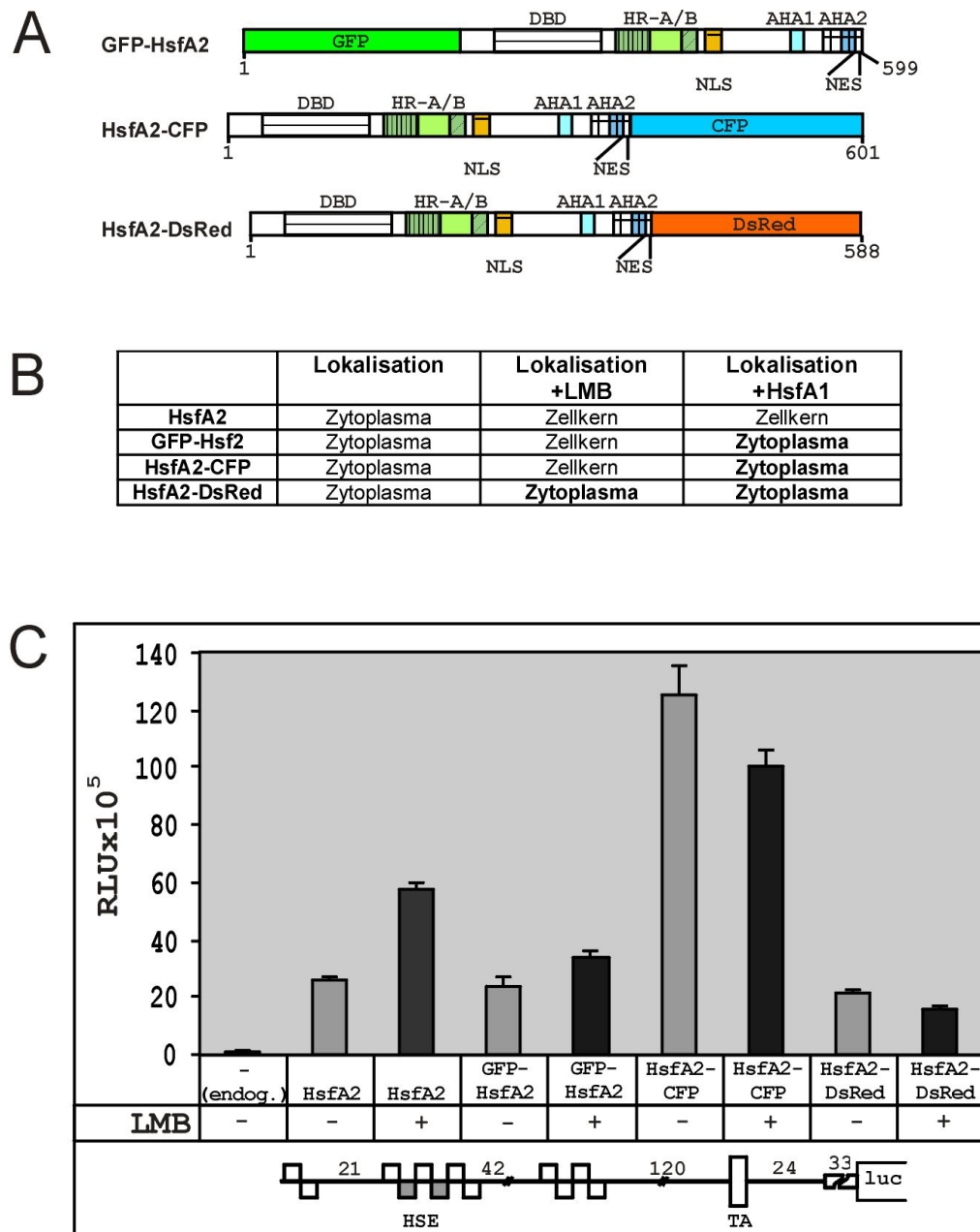
Bei den Ergebnissen fällt auf, dass die Aktivität ohne LMB-Einfluss mit Ausnahme von HsfA2-CFP bei allen HsfA2-Konstrukten in etwa gleich hoch war (siehe Abb. 16 Abbildungsteil C), und alle HsfA2-Varianten ausschliesslich im Zytoplasma nachweisbar waren (siehe Tabelle in Abb. 16 Abbildungsteil B). Die Zugabe von Leptomycin B führte nur beim HsfA2-Wildtyp zu einer Steigerung der Aktivität. Diese Zunahme war im Vergleich zu den unter 3.9 beschriebenen Experimenten geringer, was aber durch versuchsbedingte

Variationen erklärbar ist. Im Gegensatz hierzu konnte bei keiner der „getaggten“ HsfA2-Varianten eine signifikante Steigerung der Transkriptionsaktivität nach Zugabe von LMB beobachtet werden (siehe Abb. 16, Abbildungsteil C). HsfA2-CFP und HsfA2-DsRed zeigten sogar eine Abnahme der Aktivität.

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Proben fiel auf, dass sich alle HsfA2-Konstrukte, mit Ausnahme von HsfA2-DsRed, LMB-bedingt im Zellkern anreicherten, somit in der Lage waren zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herzuwandern. Der C-terminale „DsRed-Tag“ scheint somit primär den Kernimport von HsfA2 zu beeinflussen. Im Vergleich hierzu hatte der C-terminale „CFP-Tag“ keinen Einfluss auf das Import- und Exportverhalten von HsfA2, führte aber zu einer stark erhöhten Aktivität. Somit scheint nicht nur die Position des „Proteintags“ (N- oder C-terminal), sondern auch die Art und Herkunft einen Einfluss auf die Eigenschaften des „getaggten“ Proteins zu haben.

Um zu prüfen, ob die autofluoreszenten „Tags“ noch eine Interaktion mit HsfA1 zulassen, wurden CHO-K1 Zellen mit den einzelnen HsfA2-Konstrukten und HsfA1 transfiziert. Die Lokalisation der exprimierten Proteine wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (HsfA1) bzw. Auto-fluoreszenz (HsfA2-Konstrukte) bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass nur der HsfA2-Wildtyp in der Lage war mit HsfA1 zu interagieren, jedoch keines der „getaggten“ HsfA2-Konstrukte zusammen mit HsfA1 im Zellkern nachweisbar war (Abb. 16 Abbildungsteil B). Auffällig war, dass HsfA2-DsRed sogar einen Grossteil des exprimierten HsfA1 im Zytoplasma „zurückhielt“, was evtl. darauf hindeutet, dass eine Interaktion zwar stattfindet, jedoch die Importsequenzen maskiert werden.

Ferner fiel bei den Versuchen auf, dass die Expressionslevel aller „getaggten“ HsfA2-Varianten höher waren als die des Wildtyps, obwohl alle Konstrukte unter der Kontrolle eines CMV-Promotors standen.



**Abbildung 16: Luciferasereporterassay mit N- und C-terminal „getaggt“ Varianten von HsfA2**

CHO-K1 Zellen wurden mit pHsp17-luc und den in der Grafik gezeigten Aktivator-Konstrukten transfiziert und die Luciferaseaktivität 36 h nach der Transfektion gemessen. Zu den gekennzeichneten Proben wurde dem Nährmedium 6 h vor der Messung LMB (2 ng/ml) zugegeben. Im Abbildungsteil A sind Blockdiagramme der drei mit autofluoreszenten „Tags“ fusionierten HsfA2 Konstrukte abgebildet. Die Lokalisation der exprimierten Proteine ist in der Tabelle im Abbildungsteil B dargestellt. Die Luciferaseaktivität der HsfA2 Konstrukte ist in Abbildungsteil C gezeigt. Die Abkürzungen des dargestellten pHsp17-luc Reporters sind in Abb. 13 erläutert.

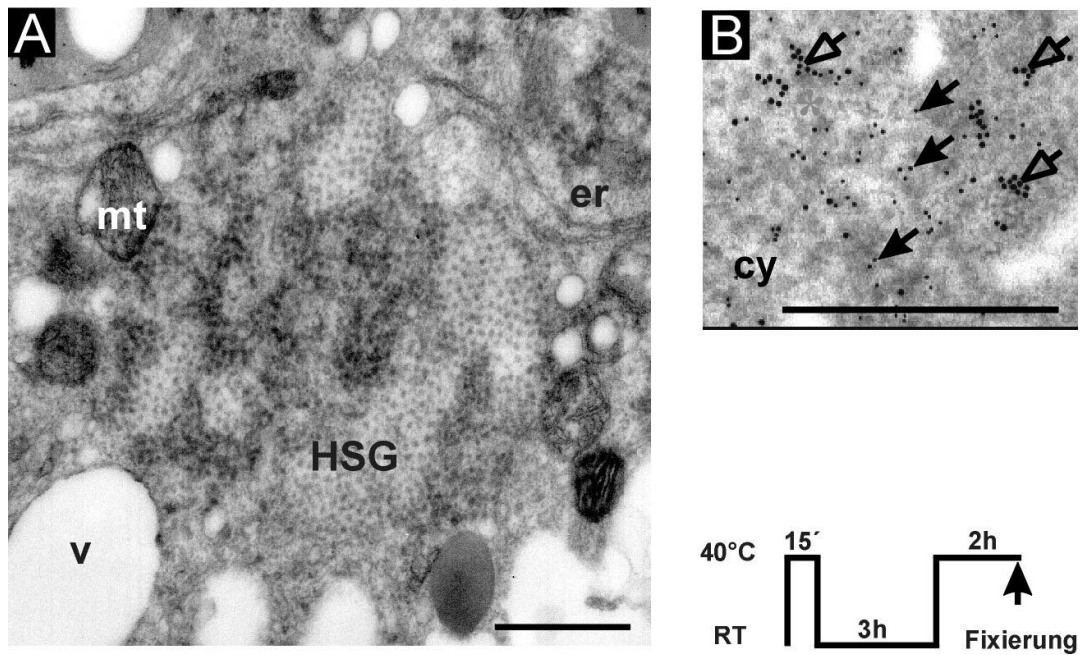
### **3.2 Interaktion von HsfA2 mit niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17-Familie**

Andauernder Hitzestress führt bei allen bisher untersuchten Pflanzenspezies zur Bildung von grossen, zytoplasmatischen Komplexen, die als Hitzestressgranula bezeichnet werden (Nover et al., 1989). Besonders gut untersucht sind diese hochmolekularen Komplexe in Tomatenzellen aus Suspensionszellkultur. Neben niedermolekularen Stressproteinen der Hsp17 Familie konnte in HSG auch HsfA2 nachgewiesen werden (Scharf et al., 1998a).

#### **3.2.1 HSG-Komplexe in Tomatenzellen**

Wie auch schon in den Versuchen von Scharf et al. (1998a) wurden thermotolerante Tomatenzellen aus Suspensionskultur nach einem zweistündigen Hitzestress fixiert und in Spurr (Struktureinbettung) bzw. LR-Gold (Immunogoldeinbettung) eingebettet. Anschliessend wurden Lp-HsfA2 und Lp-Hsp17 immunologisch auf Ultrastrukturebene nachgewiesen. Im Unterschied zu den von Scharf et al. (1998a) durchgeführten Versuchen wurden beide Proteine mit spezifischen goldkonjugierten Sekundärantikörpern, anstatt mit Protein A-Gold detektiert.

Schon in der Übersichtsaufnahme (Abb. 17A), der in Spurr eingebetteten Zellen, ist die Ultrastruktur der HSG-Komplexe im Zytoplasma hitzestresser Tomatenzellen gut erkennbar. Einzelne, stark kontrastierte, goldmarkierte HSG sind in Abbildung 17B bei stärkerer Vergrösserung sichtbar. Die 18 nm Goldpartikel entsprechen der Lokalisation von HsfA2 (gefüllte Pfeile), die 12 nm Partikel entsprechen Hsp17 (ungefüllte Pfeile). Anzumerken ist hierbei, dass aus technischen Gründen Lp-Hsp17(I) nachgewiesen wurde. Mit Versuchen, in denen Lp-Hsp17(I) zusammen mit Lp-Hsp17(II) nachgewiesen wurde, konnte jedoch auch die Kolokalisation beider zytoplasmatischer Imw-Hsp in den HSG demonstriert werden (nicht gezeigt). Die Ultrastruktur der Hitzestressgranula aus Tomatenzellen und die bisher in ihnen identifizierten Komponenten bilden den Ausgangspunkt für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen in CHO-K1 Zellen und Tabakprotoplasten.



**Abbildung 17: Nachweis von HsfA2 und Hsp17(I) in Hitzestressgranula in Tomatenzellen aus Suspensionskultur**

Thermotolerante Tomatenzellen aus Suspensionskultur wurden nach einem zweistündigen Hitzestress (siehe Piktogramm) fixiert, in Spurr (A) bzw. LR-Gold (B) eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Auf Ultradünnschnitten, der in LR-Gold eingebetteten Zellen (B), wurde Hsp17(I) und HsfA2 mit spezifischen Antisera nachgewiesen. 18 nm Goldpartikel entsprechen HsfA2 (ungefüllte Pfeile); 12 nm Goldpartikel entsprechen Hsp17(I) (gefüllte Pfeile). cy, Zytoplasma; er, Endoplasmatisches Retikulum; mt, Mitochondrien; v, Vakuole; HSG, Hitzestressgranula. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 1 µm.

### 3.2.2 Expression von Imw-Hsp und HsfA2 in CHO-K1 Zellen

Um zu überprüfen, ob die Koexpression von Imw-Hsp und HsfA2 auch in einem nichtpflanzlichen System zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate führte, wurden Ps-Hsp17(II) und Lp-Hsp17(II) einzeln, oder zusammen mit HsfA2 in CHO-K1 Zellen exprimiert. Da in allen bisher durchgeführten Versuchen immer nur eine Interaktion zwischen HsfA2 mit Klasse II Imw-Hsp beobachtet wurde und sich Lp-Hsp17(I) in CHO-K1 Zellen nicht exprimieren liess, beschränkten sich die Versuche auf die Interaktion von Hsp17(II) und HsfA2. Die Zellen wurden wie schon beschrieben transfiziert und die Proteine in der indirekten Immunfluoreszenz mit Antisera gegen Hsp17(II) bzw. HsfA2 nachgewiesen.

Im Zytoplasma von Zellen die nur Tomaten-Hsp17(II) exprimierten, reicherte sich das Protein in fadenförmigen Strukturen an (Abb. 18A, Pfeile).

Bei einigen Zellen kam es zusätzlich zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate (in Abb. 18A nicht sichtbar), die mit den fadenförmigen Strukturen perlenschnurartig assoziiert waren. Im Gegensatz hierzu führte die Expression von Erbsen-Hsp17(II) zur Bildung ringförmiger Komplexe im Zytoplasma (Abb. 18D; Pfeilspitzen), die überwiegend perinukleär lokalisiert waren.

Zur Vermeidung von Problemen, die bei der Verwendung „getaggtter“ Proteine entstehen können, wurden die Proteine bei Doppeltransfektionen jeweils einzeln in separaten Ansätzen detektiert. Dies war notwendig, weil nur Primärantikörper aus Kaninchen zu Verfügung standen.

Die Kotransfektion von Lp-Hsp17(II) mit HsfA2 führte zur Bildung ca. 1,5 µm grosser, zytoplasmatischer Komplexe, in denen beide Proteine nachweisbar waren (siehe Abbildung 18C, D). In den weiterhin vorhandenen, fadenförmigen Strukturen konnte jedoch auch bei der Koexpression mit HsfA2 nur Hsp17(II) nachgewiesen werden. Bei Experimenten mit dem schon unter 3.7 beschriebenen GFP-HsfA2 ergaben sich ähnliche Bilder (nicht gezeigt).

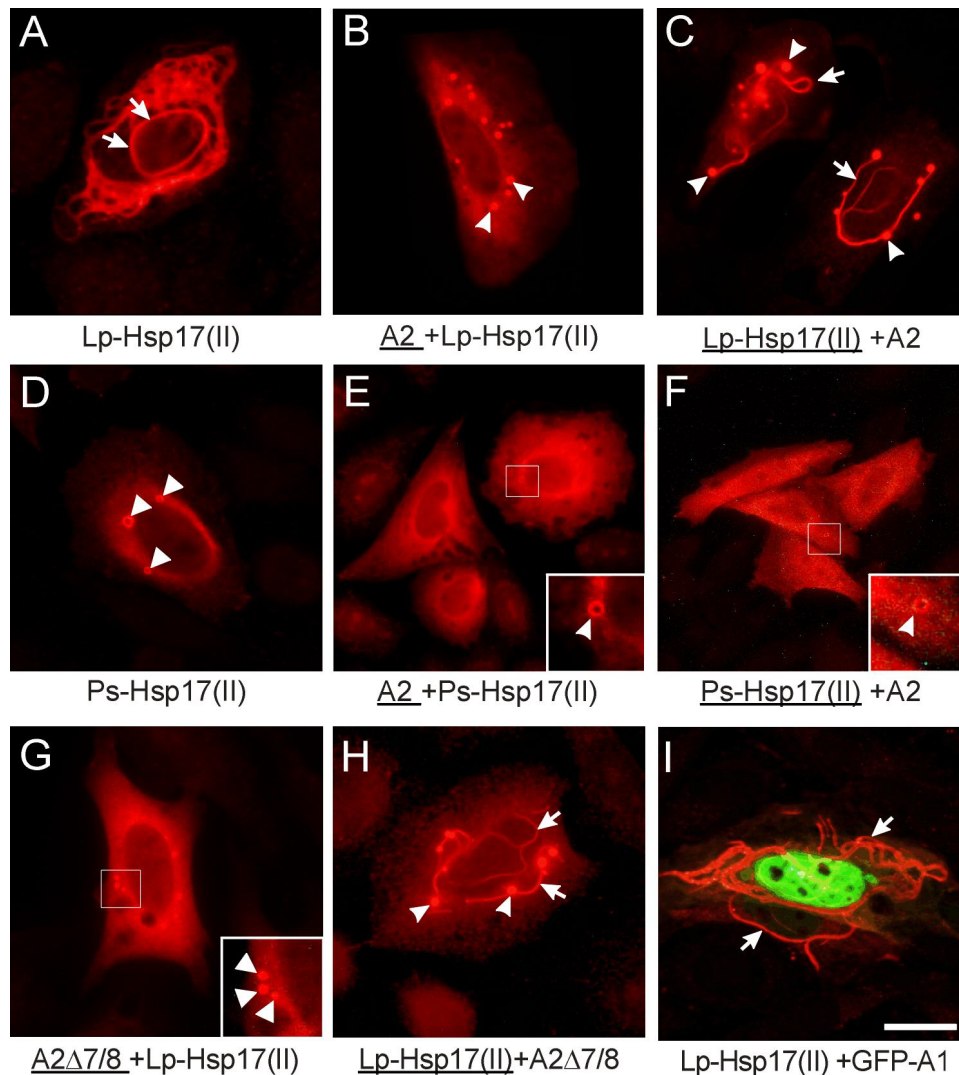
Dagegen kam es bei der Expression von Ps-Hsp17(II) mit HsfA2 nur vereinzelt zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate, in denen beide Proteine nachweisbar waren. Sowohl HsfA2 (Abb. 18E) als auch Ps-Hsp17(II) (Abb. 18F) waren in diesen Zellen gleichmässig im Zytoplasma verteilt und konnten nur vereinzelt in perinukleären, ringförmigen Strukturen lokalisiert werden (siehe Ausschnittsvergrößerungen in Abb. 18E, F).

Mit dem Ziel zu überprüfen, ob die für die Hsf-Oligomerisierung notwendige HR-A/B Region auch für die Interaktion mit Lp-Hsp17(II) wichtig ist, wurde in einem weiterführenden Experiment HsfA2 $\Delta$ 7/8 zusammen mit Lp-Hsp17(II) in CHO-K1 Zellen exprimiert. Wie auch der HsfA2-Wildtyp konnte die HR-A/B Mutante überwiegend im Zytoplasma der doppelt transfizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei es allerdings den Anschein hatte, dass sich im Gegensatz zum HsfA2-Wildtyp ein wesentlich geringerer Anteil in zytoplasmatischen Aggregaten anreicherte (vgl. Abb. 18B mit 18G Ausschnittsvergrößerung).

Das Fehlen der HR-A/B Region scheint demnach bedingt einen Einfluss auf die Interaktion und Aggregatbildung mit Lp-Hsp17(II) zu haben. Mittlerweile gibt es erste Hinweise, dass die HR-C Region für die Interaktion mit Hsp17(II) wichtig ist (mündl. Mitteilung von M. Port aus dem AK Nover).



Zur Kontrolle, ob die Interaktion spezifisch für HsfA2 ist, wurden CHO-K1 Zellen mit GFP-HsfA1 bzw. HsfB1 und Lp-Hsp17(II) kotransfiziert. Hierbei kam es weder bei GFP-HsfA1 (Abb. 18I) noch bei HsfB1 zu einer Kolokalisation mit Lp-Hsp17(II) in zytoplasmatischen Komplexen (nicht gezeigt).



**Abbildung 18: Kotransfektion von HsfA2, GFP-HsfA1 mit Lp-Hsp17(II) in CHO-K1 Zellen.**

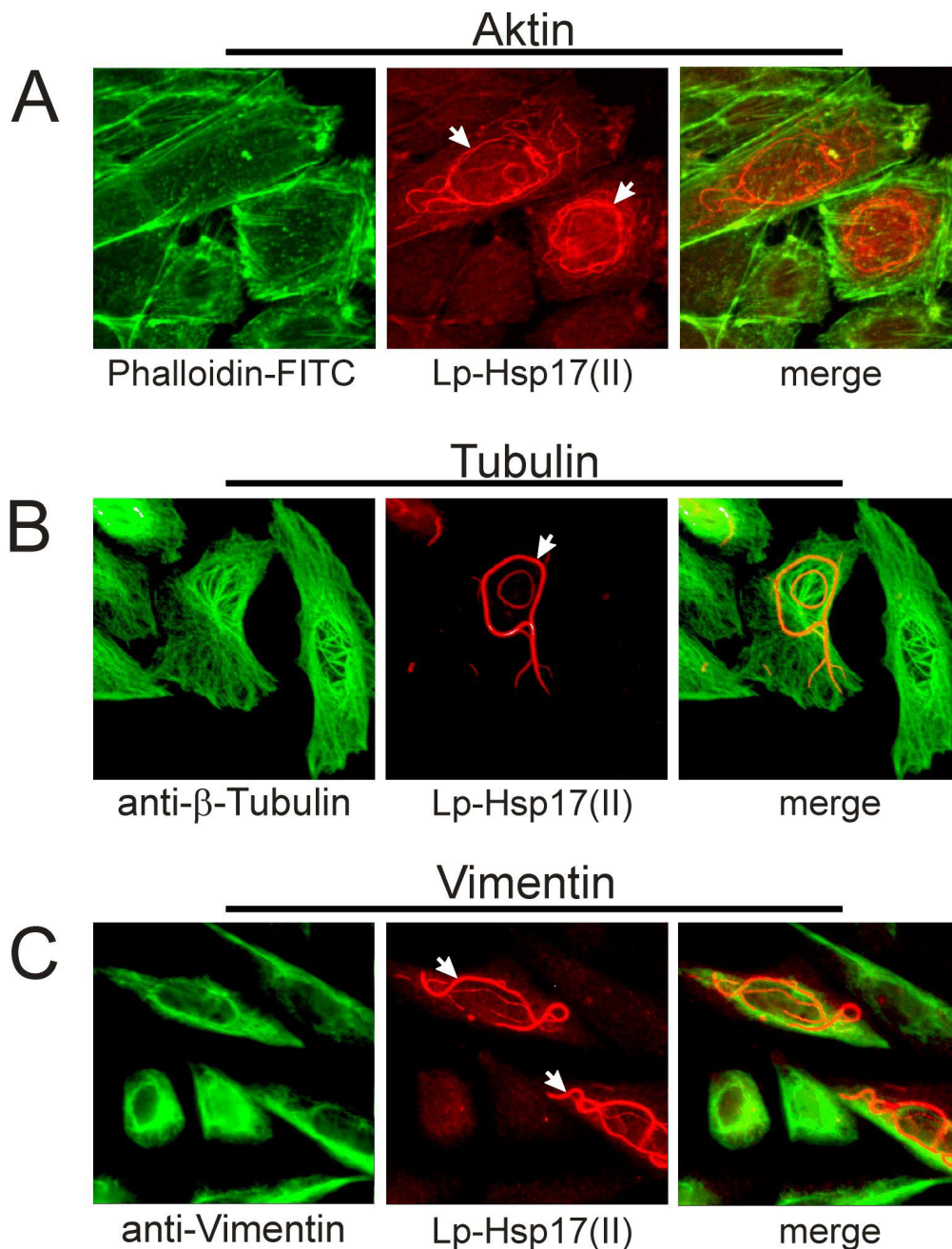
CHO-K1 Zellen wurden mit den unter den Abbildungen angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und die Proteine direkt (18I, GFP-Fluoreszenz) oder mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Bei Doppeltransfektionen wurden die Proteine einzeln, in separaten Ansätzen detektiert (unterstrichen ist das jeweils nachgewiesene Protein). Pfeilspitzen markieren zytoplasmatische Aggregate, Pfeile die fadenförmigen Strukturen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

### **3.2.3 Die fadenförmigen Strukturen des Tomaten-Hsp17(II) kolokalisieren nicht mit Bestandteilen des Zytoskeletts**

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass Hsp mit Bestandteilen des Zytoskeletts interagieren, und an dessen Formation und Funktion beteiligt sind (Übersicht in, Liang und McRae, 1997). Niedermolekulare Stressproteine der  $\alpha$ -Kristallin-Familie interagieren mit Mikrofilamenten (Aktin/Myosin) und Intermediärfilamenten (z.B. Vimentin). Sie beeinflussen nicht nur deren Polymerisation, sondern vermögen auch deren polymere Strukturen unter Hitzestressbedingungen zu schützen (Lavoie et al., 1993a, b).

Lp-Hsp17(II) ist in CHO-K1 Zellen überwiegend in zytoplasmatischen, fadenförmigen Strukturen nachweisbar. Auch wenn deren Form eher untypisch für Zytoskelettstrukturen ist, sollte mit den nachfolgenden Versuchen überprüft werden, ob zumindest teilweise eine Kolokalisation mit Bestandteilen des Zytoskeletts stattfindet. Hierzu wurden die Zellen mit Lp-Hsp17(II) kodierenden Plasmiden transfiziert und Hsp17(II) (Abb. 19 Abbildungsteil A-C; roter Kanal) zusammen mit Aktin (Abb. 19 Abbildungsteil A),  $\beta$ -Tubulin (Abb. 19 Abbildungsteil B) und Vimentin (Abb. 19 Abbildungsteil C) detektiert. Mit Ausnahme von Aktin, das mit Phalloidin-FITC nachgewiesen wurde, wurden  $\beta$ -Tubulin und Vimentin mit spezifischen, monoklonalen Primärantiseren und entsprechenden Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern (Abb. 19 Abbildungsteil A-C; grüner Kanal) lokalisiert. Neben den beiden Einzelkanälen ist jeweils noch die Überlagerung im letzten Bild dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder eine Kolokalisation von Hsp17(II) mit Aktin (Abb. 19 Abbildungsteil A),  $\beta$ -Tubulin (Abb. 19 Abbildungsteil B) noch Vimentin (Abb. 19 Bildteil C) lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. In allen drei Fällen waren die fadenförmigen Hsp17-enthaltenden Strukturen separat im Zytoplasma der untersuchten Zellen lokalisiert. In weiterführenden Versuchen muss jedoch auf elektronenmikroskopischer Ebene mit Hilfe der Immunogoldtechnik die Ultrastruktur näher untersucht werden.

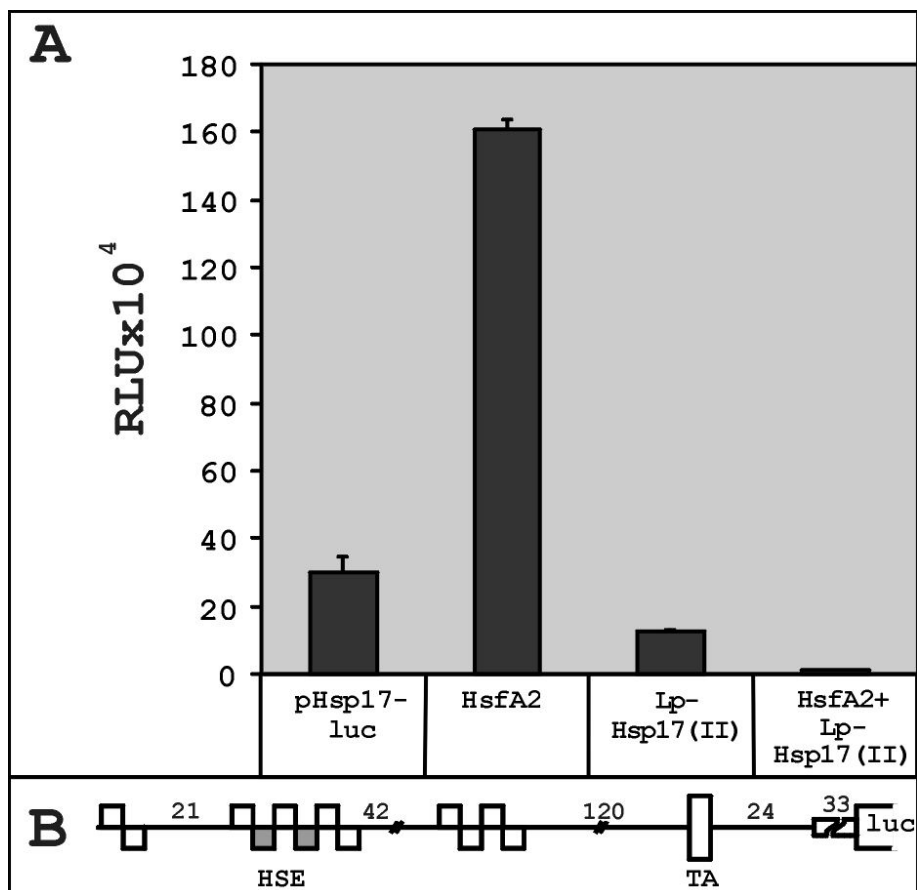


**Abbildung 19: Kolokalisation von Lp-Hsp17 und Zytoskelettproteinen**

CHO-K1 Zellen wurden mit Lp-Hsp17(II) kodierenden Plasmiden transfiziert und nach einer 24-stündigen Expressionsphase fixiert. Hsp17 wurde mit einem Klasse II-spezifischen Antiserum mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (roter Kanal). Das Aktinzytoskelett im Abbildungsteil A wurde mit Phalloidin-FITC gefärbt (grüner Kanal).  $\beta$ -Tubulin (Abbildungsteil B) und Vimentin (Abbildungsteil C) wurden indirekt mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern und Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (grüner Kanal). Im jeweils dritten Bild der Abbildungsteile A-C wurden die Einzelbilder überlagert (merge). Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

### 3.2.4 Die Strukturbindung von HsfA2 führt zu einer stark reduzierten Transkriptionsaktivität

Die Expression von HsfA2 zusammen mit Lp-Hsp17(II) führte sowohl in Tabakprotoplasten als auch in CHO-K1 Zellen zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate (vgl. mit Abb. 18B, C). Um zu überprüfen, ob die Strukturbindung von HsfA2 auch messbare Auswirkungen auf die Transaktivierungsaktivität von HsfA2 hatte, wurden beide Proteine allein oder zusammen in CHO-K1 Zellen mit einem Hsf-abhängigen Reporter (pHsp17-luc) exprimiert. Nach einer 24-stündigen Expressionsphase wurde die Luciferaseaktivität bestimmt.



**Abbildung 20: Luciferasereporterassay mit HsfA2 und Lp-Hsp17(II)**

CHO-K1 Zellen wurden mit HsfA2 und/oder Lp-Hsp17(II) transient transfiziert und die Luciferaseaktivität nach 24h Expression bestimmt (Bildteil A). Als Reporter wurde pHsp17-luc (Bildteil B) verwendet. Die Abkürzungen des dargestellten pHsp17-luc Reporters sind in Abb. 13 erläutert.

Während HsfA2 messbare, transaktivierende Eigenschaften besaß, konnten Zellen, die nur Lp-Hsp17(II) exprimierten den Luciferasereporter wie

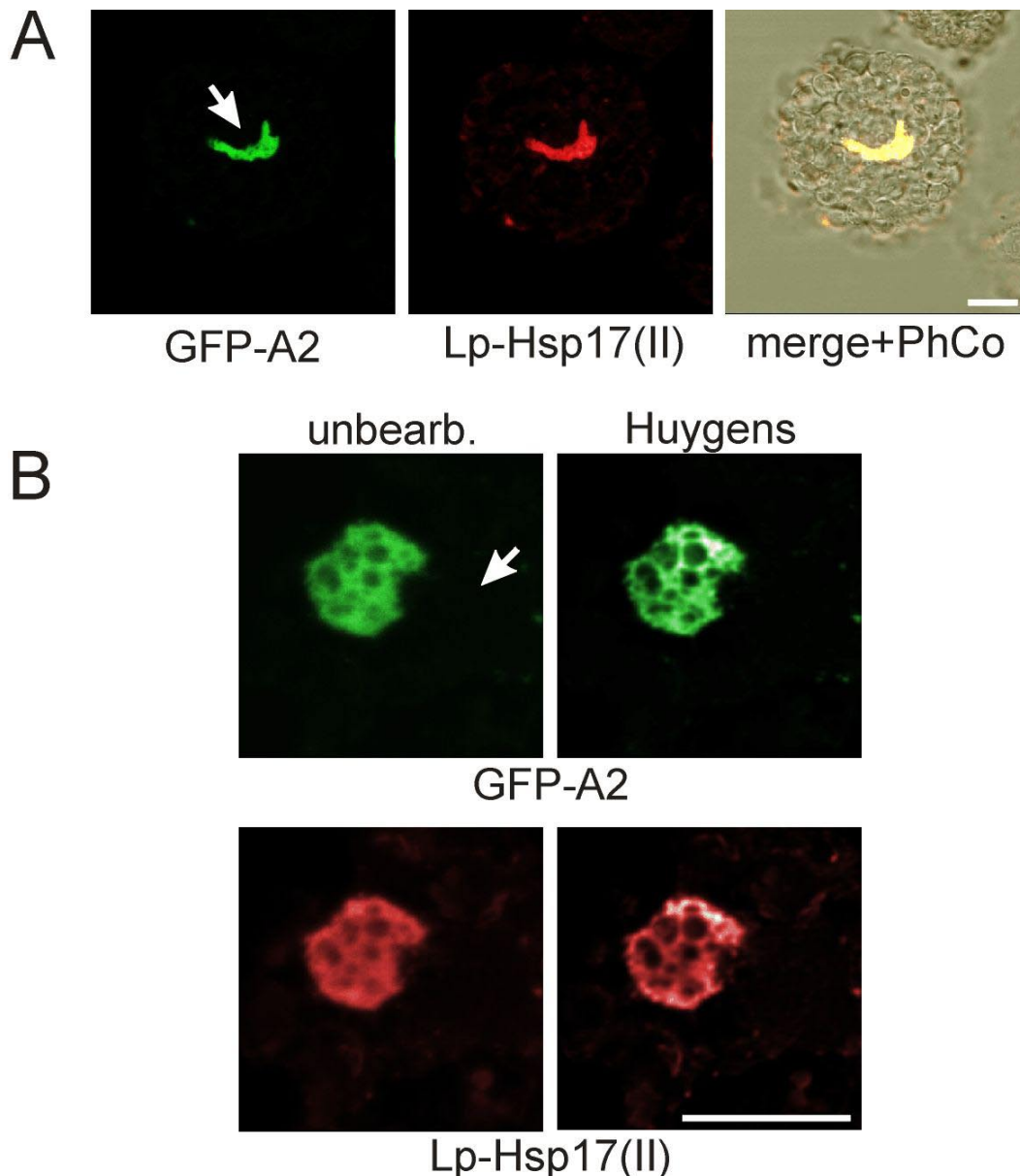
erwartet nicht aktivieren (siehe Abb. 20 Abbildungsteil A). Dass die Bindung an HSG-ähnliche Komplexe (siehe Abb. 18B, C) nicht ohne Auswirkungen auf das Transaktivierungspotential von HsfA2 blieb, konnte mit der Koexpression von HsfA2 und Lp-Hsp17(II) deutlich gezeigt werden. In diesem Fall kam es zu einer dramatischen Reduktion der Luciferaseaktivität von HsfA2, die selbst durch die Zugabe von LMB (2ng/ml) 6h vor der Aktivitätsbestimmung nicht signifikant gesteigert werden konnte (nicht gezeigt). HsfA2 scheint durch die Bindung in den unter Abb. 18B, C gezeigten zytoplasmatischen Aggregaten nicht mehr in der Lage zu sein, in ausreichenden Mengen in den Zellkern zu gelangen.

Somit besteht auch hier ein signifikanter Zusammenhang zwischen der intrazellulären Lokalisation von HsfA2 und seiner Aktivität. Die mögliche biologische Bedeutung der Bindung von HsfA2 an Lp-Hsp17(II)-Komplexe wird im Diskussionsteil ausführlicher behandelt.

### ***3.2.5 Lp-Hsp17(II) bildet in Tabakprotoplasten zusammen mit HsfA2 grosse zytoplasmatische Aggregate***

In CHO-K1 Zellen führte die Expression von HsfA2 und Lp-Hsp17(II) zur Aggregation beider Proteine in zytoplasmatischen Komplexen (siehe Abb. 18B, C). In Zellen, die nur Hsp17(II) exprimierten, reicherte sich das Protein hingegen in den gezeigten fadenförmigen Strukturen an (siehe Abb. 18A). Auch bei Tabakprotoplasten, die nur Lp-Hsp17(II) exprimierten, aggregierte das Protein schon unter Kontrollbedingungen in zytoplasmatischen Komplexen (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die Koexpression von HsfA2 und Lp-Hsp17(II) auch in Tabakprotoplasten zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate führte, wurden beide Proteine transient in Tabakprotoplasten exprimiert. HsfA2 wurde in den untersuchten Zellen als GFP-Fusionsprotein exprimiert, um eine Doppel-lokalisation zu ermöglichen. Als interne Kontrolle wurden die Versuche zusätzlich mit einem „HA-getaggten“ HsfA2 durchgeführt, wobei die Ergebnisse vergleichbar waren (nicht gezeigt). Desweiteren war bekannt, dass es auch in CHO-K1 Zellen zu einer Aggregatbildung bei gleichzeitiger Expression von GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(II) kam, der „GFP-Tag“ die Interaktion demnach nicht beeinflusste.



**Abbildung 21: Kotransfektion von GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(II) in Tabakprotoplasten**

Tabakmesophyllprotoplasten wurden mit GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(II) kodierenden Expressionsplasmiden kotransfiziert und die Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz bzw. mittels Autofluoreszenz (GFP-A2) lichtmikroskopisch nachgewiesen.

Abbildungsteil A zeigt die Übersichtsaufnahme einer ganzen Zelle, bei der in perinukleären, zytoplasmatischen Aggregaten sowohl GFP-A2 (grüner Kanal) als auch Hsp17(II) (roter Kanal) lokalisiert sind. Um die Zellumrisse und den Zellkern besser sichtbar zu machen, wurden die überlagerten Fluoreszenzkanäle nochmals mit dem Phasenkontrastbild (PhCo) überlagert (merge).

Abbildungsteil B zeigt eine konfokale Detailaufnahme eines zytoplasmatischen Komplexes aus einer anderen Zelle, der sowohl GFP-A2 (grüner Kanal), als auch Lp-Hsp17(II) (roter Kanal) enthält. Zur Verbesserung der Auflösung wurden die konfokalen Einzelbilder mittels Huygens-Algorithmus nachberechnet. Zum Vergleich sind auf der linken Seite jeweils die unbearbeiteten Rohdaten gezeigt. Mit den Pfeilen ist die Lage des Zellkerns angedeutet. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 10 µm.

Auch in den untersuchten Tabakprotoplasten konnte eine Kolo-kalisation von Lp-Hsp17(II) und HsfA2 in perinukleären Aggregaten (Abb. 21 Abbildungsteil A und B) beobachtet werden. Schon in der Übersicht (Abbildungsteil A) ist zu erkennen, dass es sich hierbei um strukturierte Komplexe handelte. Um die Feinstruktur der Aggregate lichtmikroskopisch besser sichtbar zu machen, wurden konfokale Bildstapel mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Imaris und Huygens Algorithmus kontrastverstärkt. Vorteil der Huygens Kontrastverstärkung ist, dass die Auflösung erhöht und Bildrauschen reduziert werden, ohne Bildinformationen zu verlieren. In Abb. 21 Abbildungsteil B ist jeweils die unbearbeitete- (links) der kontrastverstärkten Form (rechts) gegenübergestellt. In den huygensverstärkten Bildern ist deutlich eine wabenförmige Struktur der zytoplasmatischen Komplexe erkennbar. Ob diese Komplexe eine vergleichbare Ultrastruktur wie die in Tomatenzellen gefundenen HSG haben, muss durch weiterführende Arbeiten auf elektronenmikroskopischer Ebene geklärt werden.

### **3.2.6 Die Koexpression von HsfA2M4 und Lp-Hsp17(II) führt nicht zur Bildung grosser, zytoplasmatischer Komplexe**

Die NES-Mutante HsfA2M4 (Heerklotz et al., 2001) ist aufgrund ihrer nichtfunktionellen Kernexportsequenz ausschliesslich im Zellkern von CHO-K1 Zellen (siehe Abb. 7F) und Tabakprotoplasten (siehe Abb. 9B) nachweisbar. Es stellte sich die Frage, ob die Bindung von HsfA2 an zytoplasmatische HSG-Komplexe auch erfolgt, wenn HsfA2 nur kurzzeitig nach der Translation im Zytoplasma existent ist, bevor es sich im Zellkern anreichert.

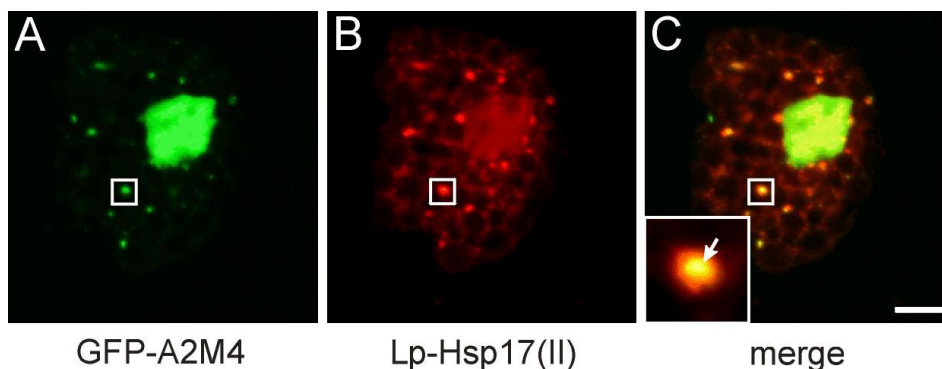
Zur Überprüfung, wurde die NES-Mutante HsfA2M4 zusammen mit Lp-Hsp17(II) in Tabakzellen exprimiert. Um beide Proteine in einer Zelle gemeinsam nachweisen zu können, wurde HsfA2M4 als GFP-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 22A). Lp-Hsp17(II) wurde mit einem gegen Hsp17(II) gerichteten Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 22B).

GFP-HsfA2M4 war in allen untersuchten Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert. Ein Teil des Proteins konnte jedoch auch in kleinen, zytoplasmatischen Aggregaten zusammen mit Lp-Hsp17(II) nachgewiesen (Abb. 22B) werden. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle



verdeutlichte, dass zumindest im Zentrum beide Proteine kolokalisieren (siehe Ausschnittsvergrößerung in Abb. 22C). Dass es nur im Zentrum zu einer Kolokalisation beider Proteine kam, lässt sich möglicherweise mit der unterschiedlichen Stabilität von GFP und Cy3 erklären.

Der direkte Vergleich mit den unter 3.2.5 dargestellten Versuchen, verdeutlicht jedoch, dass für die Entstehung grosser, zytoplasmatischer Komplexe die zytoplasmatische Lokalisation eine Grundvoraussetzung ist.



**Abbildung 22: Koexpression von GFP-HsfA2M4 und Lp-Hsp17(II) in Tabakprotoplasten**

Tabakmesophyllprotoplasten wurden mit den unter den Abbildungen angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. Der lichtmikroskopische Nachweis erfolgte nach einer 16 stündigen Expressionsphase direkt (GFP-HsfA2M4) bzw. mit einem Antikörper gegen Hsp17(II) und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Das Inlay in C zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des mit einem Quadrat umrandeten Bereichs der Abbildungen A-C. Der Massstabsbalken entspricht 10 µm.

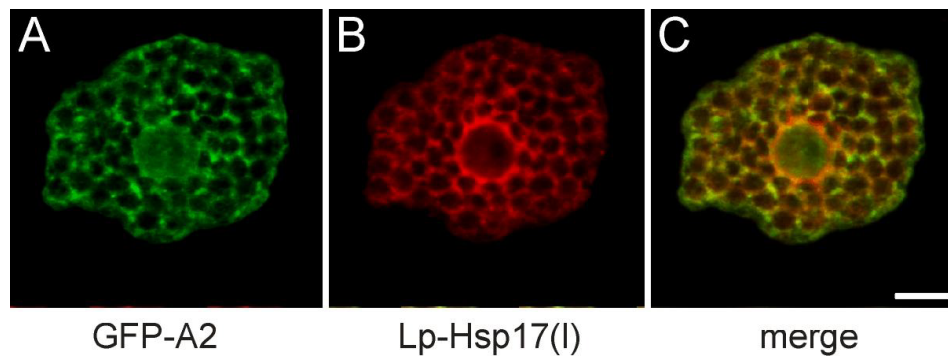
### **3.2.7 Die Koexpression von GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(I) führt nicht zur Aggregatbildung in Tabakprotoplasten**

Im „2-Hybrid Screening“ konnte immer nur eine Interaktion zwischen HsfA2 und Hsp17 Klasse II Proteinen beobachtet werden, jedoch nie eine Interaktion mit Klasse I Proteinen. Um dieses Ergebnis auch lichtmikroskopisch zu überprüfen, wurden Tabakprotoplasten mit GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17(I) kodierenden Plasmiden transfiziert und die Proteine für 16 h in den Zellen exprimiert. Die heterolog exprimierten Proteine wurden in den fixierten Zellen direkt (GFP-HsfA2) oder mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (Lp-Hsp17(I)) detektiert.

Wie auch der HsfA2-Wildtyp konnte GFP-HsfA2 überwiegend im Zytoplasma der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23A).



Vergleichbar war Lp-Hsp17(I) streng zytoplasmatisch verteilt (Abb. 23B). Die Überlagerung beider Bilder, die in Abbildung 23C dargestellt ist, zeigt, dass beide Proteine im Zytoplasma kolokalisiert sind, es aber nicht zur Bildung von HSG-Komplexen kommt. Die Ergebnisse des 2-Hybrid Interaktions Tests konnten somit auch lichtmikroskopisch *in vivo* bestätigt werden.



**Abbildung 23: Koexpression von GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17 (I) in Tabakprotoplasten**

Tabakprotoplasten wurden mit GFP-HsfA2 und Lp-Hsp17 (I) kodierenden Plasmiden kotransfiziert. GFP-HsfA2 wurde direkt, Lp-Hsp17 mit einem Antikörper gegen Hsp17(I) detektiert. In den Abbildungen A und B sind die Einzellokalisationen dargestellt. In Abbildung C ist die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle dargestellt. Der Masstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Modellsysteme für die funktionelle Untersuchung von Hsf aus Tomate

In der Pflanzenzelle ermöglicht eine konzertierte und feinregulierte Interaktion von Hsf und Hsp eine optimale Anpassung an die verschiedensten Stresssituationen. Pflanzen besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen eine weitaus höhere Anzahl verschiedener Hsf. Nover et al. (2001) beschreiben allein für *Arabidopsis* 21 Vertreter, die aufgrund phylogenetischer Vergleiche in 3 Klassen und 14 Gruppen aufgeteilt werden können. In der Perutomate konnten bisher 4 Vertreter identifiziert werden, die in zwei Klassen eingeteilt werden. Um Einblicke in die Regulation dieses komplexen Netzwerks zu bekommen, ist es unerlässlich die Funktion der einzelnen Hsf zu verstehen und ihre strukturellen Bestandteile zu charakterisieren.

Eine gängige Methode ist die Expression einzelner Hsf in heterologen Expressionssystemen. Die Tatsache, dass es sich bei Hsf um eine Proteinfamilie mit relativ hohem Konservierungsgrad und modularem Aufbau handelt, begünstigt die funktionelle Analyse in heterologen Expressionssystemen. Ferner sind die Mechanismen der Hitzestressantwort im allgemeinen sehr konserviert.

So kann beispielsweise der endogene Hsf1 aus *Saccharomyces cerevisiae* funktionell durch Tomaten-Hsf der A-Klasse ersetzt werden (Boscheinen et al., 1997; Bharti et al., 2000). Weiter wurden auch schon Hsf aus *Drosophila* und *Homo sapiens* in Pflanzenzellen, *Xenopus* Oozyten und in der Bäckerhefe untersucht (Clos et al., 1990; Treuter et al., 1993; Zuo et al., 1994; Boscheinen et al., 1997; Liu et al., 1997). Die Expression pflanzlicher Hsf in Säugerzellen stellt somit kein Novum, sondern eine bereits etablierte Alternative dar. Säugerzellen haben zudem den Vorteil, dass die lichtmikroskopische Analyse nicht durch Chloroplasten erschwert wird und dass Interaktionen mit endogenen Hsf sehr unwahrscheinlich sind. Bei der Untersuchung pflanzlicher Proteine in einem Säugerzellmodell ist es allerdings unverzichtbar, wichtige Ergebnisse parallel in einem pflanzlichen System zu verifizieren.

#### **4.1.1 Expression von Tomaten-Hsf in CHO-K1 Zellen**

Bei der Expression von Hsf aus Tomate in CHO-K1 Zellen konnte gezeigt werden, dass HsfA1 (siehe Abb. 6A) gleichverteilt zwischen Kern und Zytoplasma, HsfA2 (siehe Abb. 6B) aber streng zytoplasmatisch und HsfB1 (siehe Abb. 8A) ausschliesslich im Zellkern lokalisiert waren. Wie in Tabakprotoplasten gezeigt, führte die Koexpression von HsfA2 und HsfA1 zur Kolokalisation beider Proteine im Zellkern (siehe Abb. 6C, D). Diese Ergebnisse sind in erfreulicher Übereinstimmung mit den in Tabakzellen gewonnenen Resultaten. Sie zeigen, dass die Lokalisation der Tomaten-Hsf unabhängig vom verwendeten Expressionssystem und der Anwesenheit pflanzenspezifischer Faktoren ist, d.h. sie beruht auf intrinsischen Eigenschaften der Hsf. CHO-K1 Zellen stellen somit ein adäquates Modellsystem für die Untersuchung von Tomaten-Hsf dar.

#### **4.2 Identifikation der Kernexportsequenz von HsfA2**

Besonders interessant an den oben aufgeführten Beobachtungen ist die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2. Obwohl das Protein, wie auch HsfA1, eine funktionelle Kernimportsequenz (Lyck et al., 1997) besitzt, wurde es sowohl bei der Expression in Tabakprotoplasten als auch in CHO-K1 Zellen überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen (Scharf et al., 1998a; Heerklotz et al., 2001). In dem bisherigen Modell wurde dieses Verhalten durch eine intramolekulare „coiled-coil“-Interaktion der HR-A/B Region mit der C-terminalen HR-C Region (siehe Abb. 2) erklärt, was zur Maskierung der Kernimportsequenz führt. Für einen solchen Regulationsmechanismus sprachen die Beobachtungen, dass C-terminal verkürzte HsfA2-Mutanten (z.B. HsfA2 $\Delta$ C343) ausschliesslich im Zellkern nachweisbar waren. Ein intramolekulares „shielding“ wird auch als Regulationsmechanismus für die Aktivität des humanen Hsf1 diskutiert, wobei die Interaktion der N-terminalen HR-A/B Region mit der HR-C Region in diesem Modell jedoch die Oligomerisierung der Monomere zu Homotrimeren verhindert (Rabindran et al., 1993; siehe auch Abb. 24) und keinen direkten Einfluss auf die Lokalisation hat.

Neben einer konformationsbedingten Maskierung der Importsequenz kann auch eine konformationsbedingte Aktivierung von Transportsequenzen durch Bindung von Liganden oder Cofaktoren die Lokalisation eines Transkriptionsfaktors beeinflussen. Übertragen auf die Situation der Tomaten-Hsf könnte ein solcher Mechanismus die Kernlokalisierung von HsfA2 bei gleichzeitiger Expression von HsfA1 erklären. Scharf et al. (1998a) konnten sogar zeigen, dass selbst eine C-terminal verkürzte Form von HsfA1 (HsfA1 $\Delta$ C394) als „Carrier“ für HsfA2 dienen kann, die NLS-Mutante HsfA2M3 jedoch auch bei Koexpression mit HsfA1 nicht in den Zellkern gelangt.

#### **4.2.1 Das bisherige Modell bedarf einiger Modifikationen**

In dem oben skizzierten Kotransport-Modell kann das HsfA2-Wildtyp-Protein nur mit Hilfe von HsfA1 in den Zellkern importiert werden. Ein besseres Verständnis des Kernimport- und speziell des Kernexportprozesses führte in den letzten Jahren jedoch zu der Erkenntnis, dass auch unterschiedlich starke Import- bzw. Exportsequenzen für die zytoplasmatische Lokalisation zahlreicher Proteine verantwortlich sind (Komeili und O'Shea, 2000).

Eine Möglichkeit zur Überprüfung, ob ein Protein konstitutiv zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herwandert, ist die Inhibierung des Kernexportrezeptors Crm-1 (Exportin-1) mit dem *Streptomyces* Antibiotikum Leptomycin B (LMB, Hamamoto et al., 1983). In den Zellkern importierte Proteine, die für ihren (Re)-Export Crm-1 als Rezeptor benötigen, reichern sich in Gegenwart von LMB im Zellkern an. LMB bindet kovalent an den Exportrezeptor Crm-1, wobei die Bindung über einen hochkonservierten Cystein-Rest in der CC-Region (central conserved region, engl. zentrale, konservierte Region) des Rezeptors erfolgt (Wolff et al., 1997; Haasen et al., 1999; Kudo et al., 1998, 1999).

Mit einem solchen Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass sich sowohl HsfA2 als auch HsfA1 unter dem Einfluss von LMB im Zellkern von CHO-K1 Zellen (siehe Abb. 6E, F) und Tabakprotoplasten (siehe Abb. 9C) anreicherten. Demnach ist die NLS von HsfA2 weder maskiert, noch ist die heterologe Interaktion mit HsfA1 eine Grundvoraussetzung für den Kernimport, sondern der Export von HsfA2 ist besonders effizient.

#### 4.2.2 NES-vermittelter Kernexport von HsfA2

Dass es neben dem gut charakterisierten Kernimportprozess auch einen Kernexportprozess gibt, ist seit der Entdeckung kleiner, transferierbarer Kernexportsequenzen (NES) in den Proteinsequenzen des HIV-Rev Proteins (Fischer et al., 1995) und des Inhibitors der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Wen et al., 1995) bekannt. So konnten in den letzten fünf Jahren auch zahlreiche Rezeptoren und Sequenzmotive, die für den Kern-Zytoplasmatransport essentiell sind, identifiziert werden (siehe auch Abschnitt Einleitung). Der bekannteste Exportrezeptor ist Crm-1 der bisher in *Homo sapiens* (Fornerod et al., 1997b), *Saccharomyces cerevisiae* (Fornerod et al., 1997a) und *Arabidopsis thaliana* (Haasen et al., 1999) identifiziert und funktionell charakterisiert werden konnte. Crm-1 (Exportin-1) bindet kooperativ an Kargomoleküle mit einem Exportsignal und Ran-GTP (Fornerod et al., 1997a). Aufgrund der Fähigkeit von Crm-1 mit den sogenannten „FG-Repeats“ von Nukleoporinen zu interagieren erfolgt der Export dieses trimeren Komplexes durch den NPC ins Zytoplasma (Fornerod et al., 1997b; Neville et al., 1997).

Für den Kernexport mittels Crm-1 konnten insbesondere hydrophobe Sequenzabschnitte identifiziert werden, die überwiegend aus Leucin und Isoleucin bestehen. Gaubatz et al. (2001) definierten hierfür die folgende NES-Konsensussequenz LX<sub>2-3</sub>LX<sub>2-3</sub>LXL/I. Bei der genaueren Analyse der Proteinsequenz von HsfA2 konnte am äussersten C-Terminus im Bereich der Aktivator-domäne eine Sequenz (LQDLVDQLGFL\*) identifiziert werden, die gut in dieses Muster passte (vgl. Abb. 7 Abbildungsteil A). So führte auch die Expression von HsfA2-Mutanten, bei denen entweder die letzten 8 AS deletiert (HsfA2ΔC343, siehe Abb. 7A Abbildungsteil B), bzw. eine Substitution der letzten drei Leucine gegen Alanin vorgenommen wurde (HsfA2M4, siehe Abb. 7B Abbildungsteil B), zur Akkumulation der exprimierten HsfA2-Mutanten im Zellkern.

Zur Überprüfung der Funktionalität einer Exportsequenz (positiver Beweis) gibt es experimentell verschiedene Möglichkeiten wie: (i) „Crosslinking“ eines synthetisierten „NES-Peptids“ an fluorochromge-koppeltes Ovalbumin mit anschliessender Mikroinjektion in den Zellkern (Watanabe et al., 2000), (ii) Fusion der putativen „NES-Sequenz“ an GFP (Fischer et al., 1995), oder (iii)

sog. Heterokaryonassays, d.h. Untersuchungen über die Translokation eines Proteins zwischen zwei verschiedenen Kernen (Neufeld et al., 2000).

Zur weiteren Untersuchung der Funktionalität der NES von HsfA2 wurden die letzten 22 AS von HsfA2, an HsfB1 fusioniert (Details siehe Abschnitt Anhang). Im Gegensatz zum ausschliesslich nukleär lokalisierten Wildtyp-HsfB1 (siehe Abb. 8A, 9G) konnte das Fusionsprotein (HsfB1xA2NES) im Zytoplasma von CHO-K1 Zellen (siehe Abb. 8B) und Tabakprotoplasten (siehe Abb. 9H) nachgewiesen werden. Der Kernexport konnte, wie zu erwarten, in beiden Zellsystemen durch die Zugabe von LMB wieder inhibiert werden.

#### ***4.2.3 Kernexportsignale besitzen einen geringen Konservierungsgrad***

Auch HsfA1 reicherte sich LMB-bedingt im Zellkern von CHO-K1 Zellen an. Bei der Analyse der Proteinsequenz konnte bisher jedoch kein Abschnitt identifiziert werden, der in das Muster der „klassischen“, leucinreichen Exportsignale passt. Die Expression C-terminal verkürzter HsfA1-Mutanten zeigte jedoch, dass schon eine Deletion der letzten 54 AS zur vollständigen Kernlokalisation führte. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich ein Motif (507-NMEHLTEQM-515), das eine Homologie mit der NS2-NES (MTKKFGTLTI) des Maus-spezifischen Minute Virus (MVM, minute virus of mice) hat. Askjaer et al. (1999) konnten in einem Affinitätsassay zeigen, dass ein NES-Peptid von MVM-NS2 eine weitaus höhere Bindungsaffinität zu Crm-1 hatte, als die „klassischen“ leucinreichen NES-Peptide von HIV-Rev (Fischer et al., 1995) und PKI (Wen et al., 1995). Eine direkte Interaktion zwischen MVM-NS2 und Crm-1 konnte ferner von Bodendorf et al. (1999) mittels 2-Hybrid Interaktionsstudien gezeigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Affinität verschiedener NES-Typen zu Crm-1 durchaus variabel ist, und somit auch Einfluss auf die Lokalisation von Proteinen haben kann. Ferner wird deutlich, dass Crm-1 in der Lage ist, verschiedene Exportsignale zu erkennen, von denen einige heute noch nicht als solche identifiziert sind. Ein weiteres Beispiel für die Variabilität von Kernexportsequenzen ist die von Hoshino et al. (2000) als CLS (Cytoplasmic localisation signal, engl. Zytoplasmatisches Lokalisations Signal) bezeichnete Exportsequenz des Bach2 Transkriptionsfaktors. Für den Kern-

Zytoplasmatransport von Bach2 mittels Crm-1 sind nicht hydrophobe, sondern insbesondere hydrophile AS verantwortlich.

#### **4.2.4 Strukturmerkmale von HsfA2 für den Import und die Interaktion mit HsfA1**

Für den Import von HsfA2 in den Zellkern ist eine bipartite NLS vom SV40-Typ, die zwischen der HR-A/B Region und der Aktivator-domäne liegt, essentiell (Lyck et al., 1997). Daher reicherte sich die HsfA2M3-Mutante, bei der in einem Teil der bipartiten NLS die basischen Aminosäuren KRR durch die ungeladenen Aminosäuren QST ausgetauscht wurden, selbst nach Zugabe von LMB nicht mehr im Zellkern an (siehe Abb. 7C). Die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2 ist in diesem Fall nicht das Resultat eines dominanten Kernexportprozesses, sondern bedingt durch einen defizitären Import.

Neben dieser auch als KR-2 Region bezeichneten NLS besitzt HsfA2 eine weitere KR-reiche Region am C-Terminus der DNA-Bindungsdomäne, die als KR-1 Region bezeichnet wird. Die HsfA2-Mutante M2, bei der die basischen AS in diesem Bereich durch neutrale AS ausgetauscht wurden (Details siehe Abschnitt Anhang), reicherte sich jedoch unter LMB-Einfluss im Zellkern an. Mit diesen Versuchen konnte die KR-2 Region als eigentliche NLS noch einmal bestätigt werden.

Obwohl die Oligomerisierung einen wichtigen Schritt im Aktivierungsprozess von Hsf darstellt (Nover et al., 1997), und der Verlust der HR-A/B Region zum Verlust der Regulierbarkeit führt (Rabindran et al., 1993), ist sie für den Import von HsfA2 in den Zellkern kein essentieller Strukturbestandteil (Heerklotz et al., 2001). Demgemäss führte die LMB-Zugabe zu Zellen, die HsfA2 $\Delta$ 7/8 exprimierten, wie auch beim HsfA2-Wildtyp zur Akkumulation des Proteins im Zellkern (siehe Abb. 7F Abbildungsteil B und 9F). Eine ganz andere Bedeutung hat die HR-A/B Region jedoch für die Interaktion mit HsfA1. Scharf et al. (1998a) konnten mittels 2-Hybrid Interaktionsstudien in Hefe zeigen, dass die Interaktion von HsfA1 und HsfA2 über die für alle Klasse-A Hsf spezifische Oligomerisierungsdomäne erfolgt. Die physikalische Interaktion der beiden Proteine konnte zusätzlich *in vivo* durch Koimmunpräzipitationsversuche bestätigt werden (Scharf et al., 1998a). Die

fehlende Interaktion von HsfA2 $\Delta$ 7/8 mit HsfA1, konnte auch mit lichtmikroskopischen Untersuchungen in CHO-K1 Zellen (siehe Abb. 7G, H) und Tabakprotoplasten (siehe Abb. 9E, F) gezeigt werden. HsfA2 $\Delta$ 7/8 war auch bei Koexpression mit HsfA1 ausschliesslich im Zytoplasma der Zellen nachweisbar. Somit ist für einen Kotransport und/oder eine Retention von HsfA2 im Zellkern eine über die HR-A/B Region vermittelte Interaktion beider Proteine erforderlich. Ob die Bildung von Heterooligomeren mit HsfA1 zu einer Maskierung der NES von HsfA2 führt und somit der Re-Export ins Zytoplasma verhindert wird, muss in weiterführenden Versuchen genauer untersucht werden.

#### **4.2.5 Die Transkriptionsaktivität von HsfA2 wird stark durch seine Lokalisation beeinflusst**

Die bereits diskutierten Ergebnisse haben gezeigt, dass es sich bei HsfA2 um ein Protein handelt, dass in drei verschiedenen Formen vorkommt: (i) im Zytoplasma in löslicher Form, (ii) im Zellkern zusammen mit HsfA1 und (iii) strukturgebunden in Form zytoplasmatischer HSG-Komplexe.

Reporterassays sind ein probates Mittel, um Zusammenhänge zwischen Lokalisation und Transkriptionsaktivität zu untersuchen. Bisher wurden Reporterassays mit Tomaten-Hsf als Aktivator sowohl in Hefe als auch Tabakprotoplasten durchgeführt (Scharf et al., 1998a; Bharti et al., 2000; Doering et al., 2000). CHO-K1 Zellen stellen ein geeignetes System für solche Tests dar, was mit den in Abb. 13-16 dargestellten Luciferase-Reporterassays gezeigt werden konnte. Um die für einen sensitiven Reporterassay nötigen Grundbedingungen zu schaffen (optimale Induzierbarkeit gekoppelt mit geringer Hintergrundaktivität), wurden verschiedene Promotoren verglichen (vgl. Abb. 13). Hierbei stellte sich heraus, dass der sehr komplexe Hsp70-Promotor aus *H. sapiens* die höchste Basalaktivität hatte. Dieser sehr komplexe Promotor, besitzt nicht nur potentielle Bindungsstellen für Hsf sondern auch für zahlreiche Regulatoren wie beispielsweise CTF, Sp1 und AP2 (Williams et al., 1989). Durch die Verwendung eines Hsp17.3 Promotorfragments aus der Sojabohne (Schöffl et al., 1989) konnte die



Basalaktivität jedoch um den Faktor 60 reduziert und die selektive Aktivierbarkeit durch die Tomaten-Hsf stark gesteigert werden (vgl. Abb. 13)

Das Transaktivierungspotential von HsfA2 korreliert deutlich mit seiner Lokalisation. Hierfür sprechen folgende Befunde: (i) Der überwiegend im Zytoplasma lokalisierte HsfA2-Wildtyp besitzt nur ein geringes Aktivierungspotential, (ii) die NES-Mutante HsfA2M4, die im Zellkern lokalisiert ist, besitzt eine 300-fach höhere Aktivität als der Wildtyp, (iii) die LMB-bedingte Akkumulation von HsfA2 im Zellkern führt schon nach 3 h zu einer messbaren Steigerung der Aktivität. Ferner konnte auch der schon in Tabakprotoplasten beobachtete synergistische Transaktivierungseffekt von HsfA2 bei Koexpression mit HsfA1 gemessen werden. Im Gegensatz hierzu fehlte in CHO-K1 Zellen jedoch der in Tabakzellen messbare synergistische Transaktivierungseffekt zwischen HsfB1 und HsfA1 (vgl. Abb. 15). Dieser Effekt ist offensichtlich von der Anwesenheit pflanzenspezifischer Proteine abhängig.

#### *Auswirkung von autofluoreszenten „Tags“ auf die Aktivität von HsfA2*

Die Verwendung autofluoreszenter Proteine als Fusionspartner bzw. „Tags“ hat sich in den letzten Jahren in der Zellbiologie zunehmend etabliert (Übersicht in Sullivan und Kay, 1999). Das grün-fluoreszierende-Protein (GFP) wurde erstmals 1962 bei der Aufreinigung des chemiluminiszenten Proteins Aequorin aus der Meduse (Qualle) *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura et al., 1962). Der eigentliche Durchbruch für die Verwendung des GFP in der Zellbiologie gelang allerdings erst 1992 mit der Klonierung der für GFP kodierenden Gene (Prasher et al., 1992) und der Expression in prokaryontischen (*E. coli*) bzw. eukaryontischen (*C. elegans*) Zellen (Chalfie et al., 1994). Mittlerweile sind zahlreiche GFP-Varianten (z.B. Cyan-FP) erhältlich, die sich im Absorptions- und Emissionsverhalten, bedingt durch AS-Substitutionen im GFP-Chromophor, stark unterscheiden. Neben diesen GFP-Varianten aus *Aequorea victoria* wurde 1999 ein rotes, autofluoreszentes Protein (DsRed) aus der nichtbioluminiszenten, indopazifischen Riffkoralle *Discosoma spec.* isoliert, kloniert und für die Expression in tierischen Zellen zugänglich gemacht (Matz et al., 1999).

Ganz im Gegensatz kurzen „Peptidtags“ handelt es sich bei GFP, CFP bzw. DsRed um Proteine mit einer Grösse von etwa 30 kDa, die damit oft nur

geringfügig kleiner als ihre Fusionspartner sind. Dass bei der Fusion solcher „Tags“ an Transkriptionsfaktoren die Aktivität beeinflusst wird, konnte mit den in Abbildung 16 gezeigten Versuchen klar gezeigt werden. Auch wenn die unterschiedlichen GFP-abgeleiteten „Tags“ keinen Einfluss auf den Import und Export von HsfA2 hatten (vgl. auch Abb. 11, 12), so war doch in allen Fällen die Interaktion mit HsfA1 und möglicherweise auch mit Komponenten des Basaltranskriptionskomplexes gestört. Insbesondere letzteres wird verständlicher, wenn man berücksichtigt, dass ein N-terminaler „Tag“ direkt an die DBD und ein C-terminaler „Tag“ an die AD von HsfA2 angrenzt.

#### ***4.2.6 Regulation der Transkription durch Lokalisation, drei Beispiele***

In der vorangegangenen Diskussion sind schon zahlreiche Mechanismen beschrieben worden, mit denen in der eukaryontischen Zelle die Lokalisation von Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Eine generelle Gemeinsamkeit aller Mechanismen ist, dass sie die Zugänglichkeit der Transportsignale (NLS, NES) für die Transportrezeptoren der Importin- $\beta$  Familie regulieren. Folgende Beispiele sollen dies noch einmal verdeutlichen (siehe auch Abb. 24).

##### ***➤ Maskierung der NES von p53 durch Oligomerisierung***

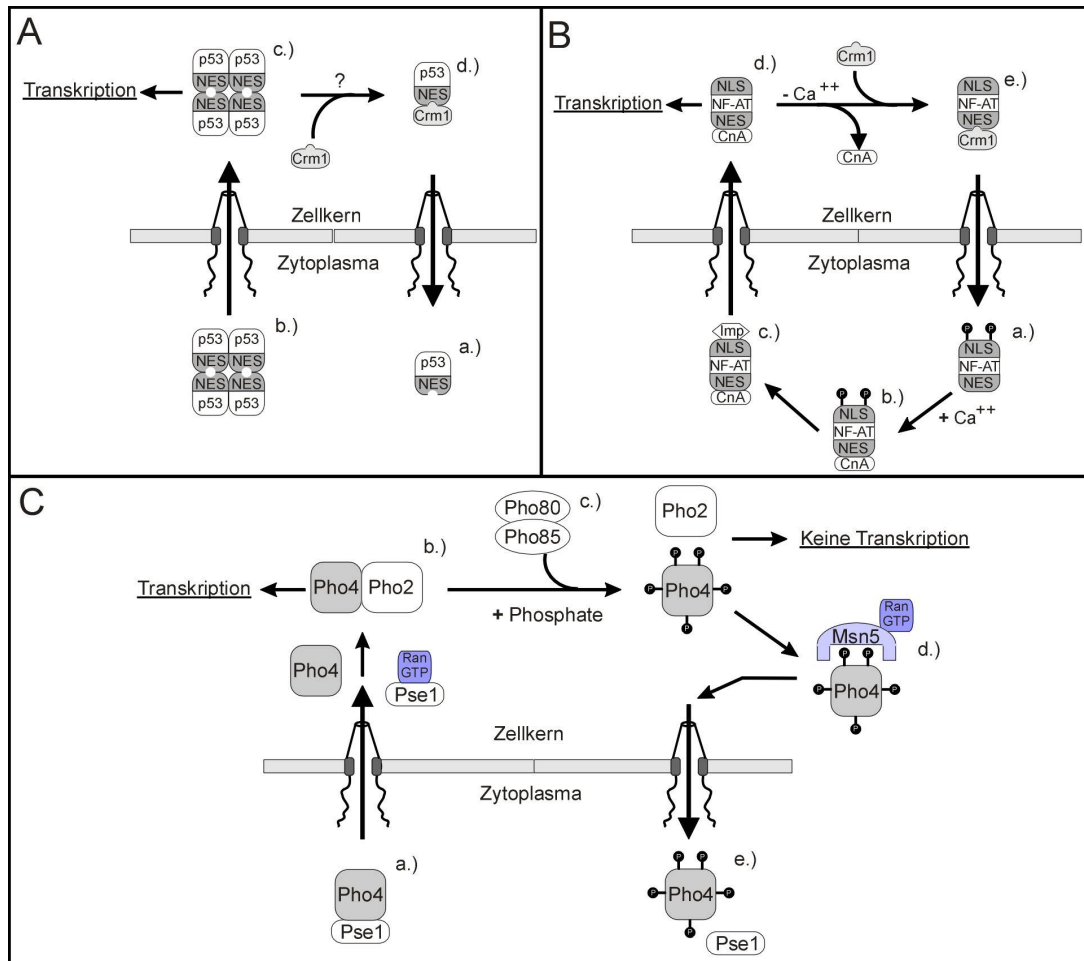
In ungestressten Zellen findet ein permanenter Import und Export der monomeren, transkriptionsinaktiven Form des Tumorsupressorproteins p53 statt (Middeler et al., 1997). Der Import von p53 erfolgt über eine C-terminale NLS (Liang und Clarke, 1999), der Export über eine im Bereich der Oligomerisierungsdomäne lokalisierte leucinreiche NES (Stommel et al., 1999). Die Tetramerisierung von p53 in die transkriptionsaktive, DNA-bindende Form führt zur Maskierung der NES und verhindert dadurch den Reexport ins Zytoplasma. Die Tetramerisierung reguliert die Aktivität von p53 somit auf zwei verschiedenen Ebenen: (i) Tetramere repräsentieren die transkriptionsaktive Form, die in der Lage ist an die DNA zu binden, (ii) die Maskierung der NES gewährleistet die nukleäre Lokalisation der p53-Tetramere.

➤ *Maskierung der NES von NF-AT durch Calcineurin*

Die Lokalisation des Transkriptionsaktivators NF-AT wird über den intrazellulären Calcium-Spiegel reguliert. Bei niedrigen Calcium-Konzentrationen ist NF-AT überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Hierfür verantwortlich ist eine phosphorylierungsbedingte Maskierung der NLS und eine leucinreiche NES. Die Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels führt zur Aktivierung und Bindung der Phosphatase Calcineurin an NF-AT. Hierbei werden höchstwahrscheinlich AS-Reste in der Nähe der NLS von NF-AT desphosphoryliert und die NES von NF-AT durch die Bindung von Calcineurin maskiert (Zhu et al., 1998; Zhu und McKeon, 1999). NF-AT wird infolgedessen in den Zellkern importiert. Interessanterweise liegt die NES genau im Bereich der Calcineurin-Bindungsstelle von NF-AT. Zhu und McKeon, (1999) postulieren ferner, dass es zu einer kompetitiven Bindung von Calcineurin und Crm-1 an NF-AT kommt. Sinkt der intrazelluläre Calcium-Spiegel wieder ab, wird Calcineurin deaktiviert und NF-AT mittels Crm-1 aus dem Zellkern exportiert.

➤ *Regulation des Kerntransports von Pho4 durch Phosphorylierung*

Der Hefe-Transkriptionsaktivator Pho4 reguliert die Transkription von Genen, die der Hefe das Überleben bei niedrigen Phosphatkonzentrationen ermöglicht (Oshima, 1997). Der Kernimport von Pho4 erfolgt bei geringen Phosphatkonzentrationen über den Importrezeptor Pse1 (Kap121), wobei dieser präferenziell nur die unphosphorylierte Form von Pho4 erkennt und in den Zellkern importiert (Kaffman et al., 1998a). Im Zellkern initiiert Pho4 kooperativ mit Pho2 die Transkription. Erhöht sich die Phosphatkonzentration, wird Pho4 an fünf verschiedenen Serinresten durch den Pho80-Pho85 Cyclin-CDK Komplex phosphoryliert und die Bindung an Pho2 gehemmt. Nur die phosphorylierte Form von Pho4 kann durch den Exportrezeptor Msn5 ins Zytoplasma exportiert werden (Kaffman et al., 1998b). Die Phosphorylierung von Pho4 verhindert somit nicht nur die Interaktion mit Pho2, sondern führt auch zum Kernexport. Ferner wird die Interaktion mit dem Importrezeptor Pse1 und der Reimport in den Zellkern verhindert. Die Regulation von Pho4 erfolgt demnach über zwei Mechanismen: (i) Regulation des Kernimports und (ii) die Regulation der Interaktion mit Pho2



**Abbildung 24: Beispiele zur Regulation der Transkriptionsaktivität nach Komeili und O'Shea (2000)**

**Abbildungsteil A: Maskierung der NES von p53 durch Oligomerisierung**

Die monomere, transkriptionsinaktive Form von p53 „shuttelt“ permanent zwischen Zytoplasma und Zellkern (a.). Die Tetramerisierung führt zur Maskierung der NES, die im Bereich der Oligomerisierungsdomäne liegt, und verhindert den Reexport von p53 ins Zytoplasma (b.). Die transkriptionsaktive Form von p53 reichert sich so im Zellkern an (c.). Der Reexport der p53-Monomere erfolgt vermutlich über Crm-1 (d.).

**Abbildungsteil B: Maskierung der NES von NF-AT durch Calcineurin**

Eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur Dephosphorylierung von NF-AT durch die Phosphatase Calcineurin (a.). Hierbei wird die NES maskiert und die NLS demaskiert (b.), was zum Kernimport von NF-AT führt (c.). Solange die NES durch die Bindung von Calcineurin maskiert ist kann NF-AT nicht durch Crm-1 exportiert werden und ist transkriptionsaktiv (d.). Die Absenkung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration inaktiviert Calcineurin und macht die NES von NF-AT für Crm-1 zugänglich, was zum Export des Transkriptionsfaktors führt (e.). CnA, Calcineurin; Imp, Importin.

**Abbildungsteil C: Regulation des Kerntransports von Pho4 durch Phosphorylierung**

Der unphosphorylierte Transkriptionsfaktor Pho4 wird bei geringen Phosphatkonzentrationen mit dem Importrezeptor Pse1 in den Zellkern importiert (a.). Im Zellkern bindet er an Pho2 und initiiert die Transkription (b.). Hohe Phosphatkonzentrationen aktivieren den Pho80-Pho85 Cyclin-CDK-Komplex, wodurch Pho4 phosphoryliert und die Interaktion mit Pho2 gehemmt wird (c.). Der Exportrezeptor Msn5 erkennt und exportiert nur die phosphorylierte Form von Pho4 ins Zytoplasma (d.), wo Pho4 aufgrund der Phosphorylierung nicht mehr mit Pse1 interagieren kann (e.).

#### **4.2.7 Für die Translokation von HsfA2 sind keine intakten Mikrotubuli erforderlich**

Obwohl die Mechanismen für den intrazellulären Transport von Organellen und membranumschlossenen Vesikeln gut verstanden sind, ist nur sehr wenig über den Transport von „nichtvesikulären“, kleinen Molekülen wie z. B. Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zelle bekannt (Langford, 1995). So gibt es eine kontroverse Diskussion über die Frage nach dem Mechanismus, der dem Transport solcher Moleküle innerhalb des Zytoplasmas zugrunde liegt. Kernpunkte der Debatte sind die Fragen, inwieweit Bestandteile des Zytoskeletts am Transport beteiligt sind und wie Proteine, die ein Kernimportsignal haben, nah genug an die Kernmembran gelangen, um mit der Importmaschinerie zu interagieren.

Auch wenn sich fast alle Transportvorgänge durch einfache Diffusion erklären lassen, gibt es doch immer mehr Hinweise, dass der zytoplasmatische Transport von Molekülen ein hochorganisierter Prozess ist, an dem Bestandteile des Zytoskeletts, insbesondere die Mikrotubuli, beteiligt sind (Vousden und Vande Woude, 2000). Mikrotubuli zeichnen sich durch eine inherente Polarität mit einem „dynamischen“ Plus-Ende, im allgemeinen an der Zellperipherie, und einem relativ stabilen Minus-Ende am Centrosom in unmittelbarer Nähe des Zellkerns aus. Die folgenden Beispiele sind stellvertretend für zahlreiche Befunde, dass einige Proteine Mikrotubuli möglicherweise als molekulare „Schienen“ verwenden, um in den Zellkern zu gelangen: (i) Die Injektion von Rhodamin-BSA mit einem NLS-Peptid, in das Axoplasma von *Aplysia californica*-Neuronen führte nur zum retrograden Transport des Reporters. Ein anterograder Transport konnte hingegen kaum beobachtet werden. Zudem führte die Zerstörung der Mikrotubuli dazu, dass der Reporter nicht mehr transportiert wurde (Ambron et al., 1992). (ii) Giannakakou et al. (2000) konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor p53 entlang der Mikrotubuli in den Zellkern transportiert wird und dabei an das Motorprotein Dynein als Kargo gebunden ist.

Allerdings gibt es auch sehr widersprüchliche Beobachtungen wie beispielsweise die Assoziation des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) mit den Mikrotubuli und dessen Transport. Galigniana et al. (1998) postulieren, dass der steroid-aktivierte GR entlang der Mikrotubuli in den Zellkern gelangt, wobei

u. a. Hsp90 für die Interaktion essentiell ist. Die Zugabe von Geldanamycin, das die Chaperonfunktion von Hsp90 durch Bindung an dessen ATP-Bindungsstelle hemmt, führte zu einer stark verlangsamten Translokation des aktivierten Rezeptors in den Zellkern.

Allerdings gelangt der Rezeptor auch nach Zerstörung aller Zytoskelettkomponenten in den Zellkern, was für einen Diffusionsmechanismus spricht. Die Autoren mutmassen jedoch, dass unter physiologischen Bedingungen, mit intaktem Zytoskelett, die Diffusion nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Der Import und Export von Hsf ist ein sehr dynamischer Vorgang, was mit den LMB-Versuchen sehr gut demonstriert werden konnte. So führte die Zugabe von LMB zu CHO-K1 Zellen, die GFP-HsfA2 exprimierten schon nach 10 min zur sichtbaren Akkumulation des Proteins im Zellkern (siehe Abb. 12). Allerdings führte die Zerstörung der Mikrotubuli nicht zu einer Beeinflussung des Importprozesses (siehe Abb. 12). Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass in Pflanzenzellen deren Zytoplasma viele Plastiden und Vakuolen enthält neben der Diffusion auch ein organisierter Transport über Mikrotubuli mit Hilfe pflanzenspezifischer Motorproteine stattfindet.

#### **4.2.8 Hitzestress führt zur reversiblen zytoplasmatischen Lokalisation von HsfA2**

Bisher gibt es nur wenige Anhaltspunkte dafür, dass Stress Kerntransportprozesse beeinflusst. Bei Versuchen mit einem NLS-GFP Reporter in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl Hitze-, Ethanol- als auch oxidativer Stress den Import des GFP-Reporters inhibierten (Stochaj et al., 2000). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die kleine GTPase Gsp1p, die unter Kontrollbedingungen ausschliesslich im Zellkern lokalisiert ist, bei den untersuchten Stressbedingungen gleichverteilt zwischen Kern und Zytoplasma vorlag. Dies könnte als ein möglicher Grund für die Hemmung diskutiert werden (vgl. Ran-GTP Zyklus im Abschnitt Einleitung). Kedersha et al. (1999) diskutieren, dass die beiden RNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR sich unter Hitzestress im Zytoplasma in sog. Stressgranula (SG) anreichern, weil es zu einer stressbedingten Beeinflussung des Protein-Imports in den Zellkern kommt.

Ferner postulieren sie, dass sich insbesondere Proteine in tierischen SG anreichern, die zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herwandern.

Im Gegensatz zu den von Stochaj et al. (2000) und Kedersha et al. (1999) beschriebenen Beobachtungen, konnte bei den in CHO-K1 Zellen untersuchten Hsf keine prinzipielle Beeinträchtigung der Import- und Exportprozesse unter Hitzestress beobachtet werden (siehe Abb. 10, 11). HsfB1xA2NES wurde auch unter Hitzestress ins Zytoplasma exportiert und reichte sich unter LMB-Einfluss im Zellkern an (siehe Abb. 10A, B). Relativ unerwartet war daher das Verhalten von HsfA2, der unter Hitzestress, auch unter LMB-Einfluss, nicht mehr in den Zellkern importiert wurde (siehe Abb. 10G, H). Die HsfA2-Mutante, bei der die Oligomerisierungsdomäne deletiert ist (HsfA2 $\Delta$ 7/8), konnte jedoch auch unter Hitzestress in den Kern importiert werden (siehe Abb. 10E, F). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die NLS von HsfA2 durch eine hitzestressbedingte Konformationsänderung unzugänglich wird. Diese Konformationsänderung findet jedoch nur statt, wenn die HR-A/B Region vorhanden ist. In dieses Bild passte auch die Beobachtung, dass HsfA2 bei gleichzeitiger Expression mit HsfA1 auch weiter im Zellkern lokalisiert war. Die Heterooligomerisierung verhindert offensichtlich eine mögliche Maskierung der NLS von HsfA2 (siehe Abb. 10C, D). Ein weiterer Hinweis auf eine vorübergehende, konformationsbedingte Retention im Zytoplasma war die Beobachtung, dass sich HsfA2 unter LMB-Einfluss schon 15 min nach dem Hitzestress wieder in sichtbaren Mengen im Zellkern anreicherte und nach einer Stunde nur noch im Zellkern nachweisbar war (siehe Abb. 11).

Die zytoplasmatische Lokalisation von HsfA2 unter Hitzestress könnte auch die Anreicherung von HsfA2 in HSG-Komplexen erklären (vgl. Abb. 17). Die Interaktion von HsfA2 und Imw-Hsp, die im zweiten Teil der Arbeit untersucht wurde soll im nachfolgenden Teil der Diskussion behandelt werden.

#### **4.3 Expression von pflanzlichen Imw-Hsp in CHO-K1 Zellen**

Bei bisher allen untersuchten Organismen führt Hitzestress zur Synthese von Imw-Hsp. Auch wenn sich Imw-Hsp stark in ihrer monomeren Masse

unterscheiden, besitzen sie doch alle die Eigenschaft, oligomere Strukturen variabler Grösse zu bilden, wobei die Oligomere, abhängig vom Protein, aus 9 bis 30 Untereinheiten bestehen können (Vierling, 1997). Im Gegensatz zu tierischen Zellen, sind Imw-Hsp in den meisten vegetativen Pflanzengeweben nur unter Stresseinwirkung nachweisbar (siehe auch Abschnitt Einleitung). Pflanzliche Imw-Hsp werden in 5 Klassen eingeteilt, wobei die Einordnung neben der organellspezifischen Lokalisation und DNA-Sequenzhomologien auch über die Kreuzreaktivität bei immunologischen Nachweisen erfolgt (Waters et al., 1996; Scharf et al., 2001).

Ein weiteres Kennzeichen aller bisher untersuchten Pflanzenspezies ist die Bildung hochmolekularer Strukturen im Zytoplasma unter Hitzestress (Nover et al., 1989; Kirschner et al., 2000). Diese als Hitzestressgranula (HSG) bezeichneten Multichaperonkomplexe bestehen hauptsächlich aus Imw-Hsp der Hsp17-Familie (Scharf et al., 1998a) und Hsp70 (Neumann et al., 1987). Elektronenmikroskopische Analysen haben ergeben, dass HSG-Komplexe aus zahllosen, einzelnen 40 nm-Partikeln bestehen (siehe Abb. 17). Obwohl die strukturellen Bestandteile grösstenteils identifiziert wurden, sind doch die Erklärungen für die Funktion der HSG sehr weitläufig.

#### **4.3.1 HSG-Komplexe als Speicherort für untranslatierte poly(A)<sup>+</sup>-RNA**

Die stressinduzierte Inhibierung der Translationsinitiation führt zu einem als polysomalen „Run-off“ bezeichneten Prozess, bei dem die Polysomen zerfallen und Haushalts-mRNP (poly(A)<sup>+</sup>-RNA und damit assoziierte Proteine) freigesetzt werden. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass unter Hitzestress präferentiell mRNA von Hsp translatiert wird.

Interessanterweise kommt es auch bei Zellen, die sich in Anwesenheit von Actinomycin D von einem Hitzestress erholen, sofort wieder zur Translation von Haushalts-RNA, was den Rückschluss zulässt, dass die freigesetzte mRNA nicht abgebaut wurde (Lindquist, 1981). In diesem Zusammenhang postulieren Nover et al. (1989), dass HSG-Komplexe auch eine Speicher- bzw. Schutzfunktion für untranslatierte RNA von Haushaltsproteinen haben.

Auch in tierischen Zellen kommt es unter Hitzestress zur Bildung von zytoplasmatischen Komplexen, die als Stressgranula (SG) bezeichnet werden und grösstenteils aus Hsp27 (Collier et al., 1988) bestehen. Kedersha et al.



(1999), konnten zeigen, dass SG neben Hsp27 auch die RNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR enthalten und mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung poly(A)<sup>+</sup>-RNA darin nachweisen. Weiter konnten sie zeigen, dass sowohl TIA-1 als auch TIAR in der Lage sind, poly(A)<sup>+</sup>-RNA zu binden und eine Tendenz zur Selbstaggregation besitzen.

#### **4.3.2 HSG binden partiell entfaltete Proteine**

Eine zweite von vielen Autoren diskutierte Theorie ist, dass HSG-Komplexe eine Matrix für partiell, entfaltete Proteine unter Hitzestress darstellen (Kimpel und Key, 1985; Kirschner et al., 2000). Die Bindung von partiell entfalteten, nicht-nativen Proteinen findet hierbei über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Oberfläche der Hsp statt (Lee et al., 1997). Der Schutz der Proteine findet somit passiv über die Bindung statt (Das und Surewicz, 1995; Das et al., 1996). Die Renaturierung der gebundenen Substrate kann jedoch nur in Anwesenheit von Hsp70 und ATP erfolgen (Forreiter et al., 1997).

Für ein solches Modell spricht die Tatsache, dass die in Pflanzenzellen gefundenen HSG überwiegend aus Chaperonen der Hsp70- und Hsp20-Familie bestehen und somit alle Grundvoraussetzungen für das oben beschriebene Modell hätten. Eine solche Funktion schliesst natürlich die Bindung von RNP-Material nicht aus.

In diesem Zusammenhang lässt sich möglicherweise auch die Bindung von HsfA2 an HSG unter Hitzestress erklären, wobei bisher noch nicht genau geklärt ist, wie die Interaktion erfolgt. Ebenso ist immer noch offen, ob sich HsfA2 an der Oberfläche der HSG-Matrix anlagert, oder Teil der HSG wird. Der immunologische Nachweis von HsfA2 und Hsp17 auf Ultrastrukturebene zeigte immer eine Gleichverteilung beider Proteine in den HSG, und eine direkte Zuordnung der Goldmarkierung zu diskreten Strukturen in den HSG war bisher nicht möglich (siehe Abb. 17; Scharf et al., 1998a). Auch ist noch nicht verstanden, inwieweit die Bindung von HsfA2 mit ultrastrukturellen Veränderungen der HSG verbunden ist.

*Die Interaktion zwischen HsfA2 und Imw-Hsp ist klassen- und artspezifisch*

Wie bereits erwähnt gibt es bei pflanzlichen Zellen zwei zytoplasmatische Imw-Hsp-Klassen, die als Klasse I und II bezeichnet werden (Wehmeyer und Vierling, 2000). Die Sequenzhomologie in der  $\alpha$ -Kristallin-Domäne beträgt nur ca. 50 %, wobei sich die phylogenetische Trennung wahrscheinlich vor mehr als 400 Millionen Jahren vollzogen hat (Waters und Vierling, 1999). In direkten Interaktionsstudien im Hefe 2-Hybrid-System konnte mit einem HsfA2-Köderkonstrukt interessanterweise immer nur eine Interaktion mit Imw-Hsp der Klasse II aus der gleichen Spezies (Tomate) beobachtet werden (Diplomarbeit M. Port aus dem AK Nover). Diese hochspezifische Interaktion, bezüglich der Imw-Hsp-Klasse und der Spezies, lässt Rückschlüsse auf einen konservierten Mechanismus zu, der möglicherweise auch in anderen Pflanzen nachweisbar ist (siehe weiterführende Arbeiten).

Die Interaktion von HsfA2 und Lp-Hsp17(II) war sowohl in CHO-K1 Zellen als auch in Tabakprotoplasten nachweisbar. Auch hier konnte die Bildung grosser, zytoplasmatischer Komplexe nur zwischen HsfA2 und Klasse II Imw-Hsp aus Tomate beobachtet werden (vgl. Abb. 21, 23). Anzumerken ist an dieser Stelle, dass sich Lp-Hsp17(I) in CHO-K1 Zellen nicht transient exprimieren liess und somit die klassenspezifische Interaktion in den tierischen Zellen nicht überprüfbar war. Die Bildung zytoplasmatischer Komplexe, die HsfA2 und Imw-Hsp enthielten, konnte jedoch unabhängig vom Expressionssystem beobachtet werden.

Noch unklar ist, welche Strukturelemente von HsfA2 an der Interaktion beteiligt sind. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise dafür, dass die HR-A/B Region von HsfA2 für die Interaktion mit Imw-Hsp17 wichtig ist. So konnte bei CHO-K1 Zellen, die anstatt dem Wildtyp HsfA2 $\Delta$ 7/8 zusammen mit Lp-Hsp17(II) exprimierten, der überwiegende Teil von HsfA2 $\Delta$ 7/8 im Zytoplasma nachgewiesen werden (siehe Abb. 18G). Unterstützt werden diese Befunde durch Ergebnisse aus sogenannten „Pulldown“-Assays, bei denen keine Interaktion zwischen HsfA2 $\Delta$ 7/8 und Lp-Hsp17(II) mehr beobachtet werden konnte (Promotionsarbeit R. Calligaris FB Biologie und Informatik, 2001). Die Tatsache, dass die Interaktion von Imw-Hsp mit partiell entfalteten Proteinen insbesondere über hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet (Sharma et al., 1998; Smulders und de Jong, 1997), könnte die Bedeutung der hydrophoben

HR-A/B Region für die Interaktion erklären. Ob möglicherweise auch die HR-C Region für die Bindung eine wichtige Funktion hat muss noch weiter untersucht werden, wobei es erste Hinweise dafür gibt (siehe Abschnitt weiterführende Arbeiten).

*Findet über die Bindung von HsfA2 an HSG-Komplexe eine Regulation statt?*

Die Frage nach dem biologischen Hintergrund für die Bindung von HsfA2 an die HSG-Komplexe ist schwierig zu beantworten. Möglich wäre zum einen, dass HsfA2 ein thermosensitives Protein wie beispielsweise Luciferase ist und durch die Bindung an HSG-Komplexe vor hitzebedingter Denaturierung geschützt wird.

Weitaus sinnvoller scheint jedoch ein Modell, bei dem die Bindung von HsfA2 an HSG-Komplexe einen posttranslationalen Regulationsmechanismus (eine Art „Feedback“-Hemmung) darstellt. Hierfür spricht der Befund, dass die Koexpression von HsfA2 und Lp-Hsp17(II) zum Verlust der Transkriptionsaktivität von HsfA2 führte (siehe Abb. 20). Selbst durch die Zugabe von LMB konnte diese nicht merklich gesteigert werden. Die Menge an aktivem HsfA2 würde so reguliert werden.

#### **4.4 Offen gebliebene Fragen und weiterführende Arbeiten**

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wichtige neue Erkenntnisse gewonnen werden, die dazu beitragen, das komplexe Regulationsnetzwerk pflanzlicher Hsf besser zu verstehen. Viele Fragen sind noch unbeantwortet geblieben und neue Fragen sind entstanden. Im nachfolgenden Abschnitt der Diskussion sollen diese kurz zusammengefasst und Perspektiven für weitere Versuche aufgezeigt werden.

➤ **Reportergenassays unter Hitzestressbedingungen**

Erste Vorversuche haben gezeigt, dass sich die Aktivität von Tomaten-Hsf, die in CHO-K1 Zellen exprimiert werden, durch einen einstündigen Hitzestress bei 41°C stark erhöht. Da es sich bei der Luciferase jedoch um ein thermosensitives Enzym handelt, das bei dieser Temperatur bereits zu denaturieren beginnt, sind solche Versuche nur auswertbar, wenn der Anteil an denaturierter Luciferase ermittelt werden kann.

Eine gute Alternative würde ein Reporterassay darstellen, bei dem anstatt der thermosensitiven Luciferase, GFP oder DsRed als Reporter verwendet wird. Die Messung kann bei solchen Assays direkt nach dem Hitzestress fluorometrisch erfolgen. Zudem kann bei solchen Ansätzen die maximale Probenzahl deutlich erhöht werden, da die Lyse der Zellen, und die Zugabe der Substratlösung entfällt. Möglich wären auch Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten des Hitzestresses direkt im Fluorometer, falls dieses temperierbar ist.

➤ Strukturelemente für die Interaktion von HsfA2 mit Imw-Hsp

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von HsfA2 zusammen mit Klasse II Imw-Hsp aus Tomate unabhängig vom verwendeten Expressionssystem zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate führte, in denen beide Proteine nachgewiesen werden konnten.

Es ist bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche Funktion die HR-A/B und/oder die HR-C-Region von HsfA2 für diese Interaktion spielt. *In vitro* Ergebnisse aus „Pulldown-Assays“ zeigten, dass die HR-A/B Region für eine Interaktion essentiell ist (Promotionsarbeit R. Calligaris FB Biologie und Informatik, 2001). Es gibt aber auch erste experimentelle Befunde für eine Funktion der HR-C Region (Diplomarbeit M. Port aus dem AK Nover). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten eher auf eine Funktion der HR-A/B Region hin, da es bei Koexpression von Lp-Hsp17(II) und HsfA2 $\Delta$ 7/8 nur sehr vereinzelt zur Aggregatbildung kam und der überwiegende Teil von HsfA2 löslich im Zytoplasma vorlag.

Um hier eindeutige Ergebnisse zu erhalten, müssen in weiteren Versuchen HsfA2-Mutanten in die Tests mit einbezogen werden, bei denen nur Teile der HR-A, HR-B bzw. HR-C Region deletiert sind, bzw. die Funktion der Oligomerisierungsdomäne durch Austausch bestimmter AS zerstört ist. Ferner sollten die bisherigen Ergebnisse mit Hilfe der Koimmunpräzipitation überprüft werden.

Ebenfalls noch nicht geklärt ist die Frage, warum die Interaktion so spezifisch zwischen HsfA2 und Hsp17(II)-Proteinen aus Tomate stattfindet. Es wäre sicher lohnenswert zu prüfen, ob es eine vergleichbare Interaktion zwischen den bisher identifizierten *Arabidopsis* Hsf und Klasse II Imw-Hsp aus

*Arabidopsis* gibt. Für eine erste Selektion potentieller Kandidaten würde sich ein Hefe 2-Hybrid Interaktionstest eignen.

➤ Ultrastrukturanalyse von Hsp-Hsf Komplexen in CHO-K1 Zellen und Tabakmesophyllprotoplasten

Bei ersten Ergebnissen aus Ultrastrukturanalysen von CHO-K1 Zellen, die HsfA2 und Lp-Hsp17(II) exprimierten, konnten im Zytoplasma einiger Zellen stärker kontrastierte Bereiche identifiziert werden, die möglicherweise die lichtmikroskopisch sichtbaren granulären Komplexe repräsentieren. Ohne die genaue Lokalisation der beteiligten Proteine mit Hilfe der Immunogoldtechnik ist jedoch eine eindeutige Zuordnung im Augenblick nicht möglich. Ferner fehlen Ultrastrukturdaten der „wabenförmigen“ Komplexe, die sich in Tabakprotoplasten bilden, die HsfA2 und Lp-Hsp17(II) exprimieren. Die Huygens-Kontrastverstärkung konnte zwar Strukturdetails sichtbar machen, jedoch fehlen auch hier Ultrasstrukturaufnahmen, die den Vergleich mit Tomaten-HSG zulassen würden.

➤ „Photobleaching“-Versuche in „HSG-ähnlichen“ Granulakomplexen

In Tomatenzellen ist die Entstehung und der Abbau der HSG-Komplexe ein sehr dynamischer Prozess. Bisher ist allerdings unklar, ob die Bindung von HsfA2-Molekülen während des Hitzestresses reversibel ist, oder ob gebundenen Moleküle erst nach dem Hitzestress wieder aus der Strukturbindung entlassen werden.

Um dies zu untersuchen, müssten *in vivo* Beobachtung in GFP-A2 und Lp-Hsp17(II) transfizierten CHO-K1 Zellen oder Tabakprotoplasten durchgeführt werden. Mit einem Laserstrahl könnten gezielt einzelne Teile der Granulakomplexe ausgebleicht („Bleaching“) werden. In bestimmten Zeitabständen müsste untersucht werden, ob in diesen Bereichen neue Fluoreszenz nachweisbar ist. Mit dieser Methode könnte festgestellt werden, ob sich neue Hsf-Moleküle in die HSG-Komplexe einlagern.

➤ Nachweis von RNA in HSG

Neben HsfA2, Hsp70 und Imw-Hsp diskutieren Nover et al. (1989), dass HSG auch als Speicher für RNA von Haushaltsproteinen dienen (siehe 4.3.X).

Ferner wird diskutiert, dass möglicherweise auch RNA von Hsf in den HSG gespeichert wird.

Bisher ist der Nachweis von RNA mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung auf Ultrastrukturebene jedoch nicht gelungen. Anstatt mit spezifischen Sonden für Hsf-RNA, könnte mit Oligo-dT Sonden poly(A)<sup>+</sup>-RNA nachgewiesen werden. Eine Alternative stellt die von Biggiogera und Fakan (1998) entwickelte Methode dar, mit der RNA auf Ultradünnschnitten von eingebetteten Zellen mit Hilfe von Terbiumcitrat spezifisch angefärbt werden kann.

## 5 Literaturverzeichnis

**Akey, C.W., Radermacher, M. (1993).** Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* **122**: 1-19

**Ambron, R.T., Schmied, R., Huang, C.C., Smedman, M. (1992).** A signal sequence mediates the retrograde transport of proteins from the axon periphery to the cell body and then into the nucleus. *J. Neurosci.* **12**: 2813-2818

**Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W., Fornerod, M. (1999).** RanGTP-regulated interaction of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 6276-6285

**Ananthan, J., Goldberg, A.L., Voellmy, R. (1986).** Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**: 522-524

**Arrigo, A.-P., Landry, J. (1994).** The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (Morimoto, R.I., ed). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, N.Y. 335-373

**Aquino, D.A., Capello, E., Weisstein, J., Sanders, V., Lopez, C., Tourtellotte, W.W., Brosnan, C.F., Raine, C.S., Norton, W.T. (1997).** Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**: 664-672

**Biggiogera, M., Fakan, S. (1998).** Fine structural specific visualization of RNA on ultrathin sections. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 389-395

**Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Rommelaere, J., Salome, N. (1999).** Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **73**: 7769-7779

**Boscheinen, O., Lyck, R., Queitsch, C., Treuter, E., Zimarino, V., Scharf, K.-D. (1997).** Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace *HSF1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 322–331

**Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Heerklotz, D., Bublak, D., Scharf, K.-D. (2000).** Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant J.* **22**: 355-365

**Caspers, G.-J., Leunissen, J.A.M., de Jong, W.W. (1995).** The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved „ $\alpha$ -crystallin domain“. *J. Mol. Evol.* **40**: 238-248

**Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805

**Chen, Y., Barlev, N.A., Westergaard, O., Jakobsen, B.K. (1993).** Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *EMBO J.* **12**: 5007-5018

**Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K., Wu, C. (1990).** Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* **63**: 1085-1097

**Collier, N.C., Heuser, J., Levy, M.A., Schlesinger, M.J. (1988).** Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **106**: 1131-1139

**Craig, E.A., Weissman, J.S., Horwich, A.L. (1994).** Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* **78**: 365-372



**Damberger, F.F., Pelton, J.G., Harrison, C.J., Nelson, H.C.M., Wemmer, D.E. (1994).** Solution structure of the DNA binding domain of heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* **3**: 1806-1821

**Das, K.P., Surewicz, W.K. (1995).** On the substrate specificity of alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Biochem. J.* **311** (Pt 2): 367-370

**Das, K.P., Petrash, J.M., Surewicz, W.K. (1996).** Conformational properties of substrate proteins bound to a molecular chaperone alpha-crystallin. *J. Biol. Chem.* **271**: 10449-10452

**Dascher, C.C., Poddar, S.K., Maniloff, J. (1990).** Heat shock response in mycoplasmas, genome limited organisms. *J. Bacteriol.* **172**: 1823-1827

**de Jong, W.W., Caspers, G.-J., Leunissen, J.A.M. (1998).** Genealogy of the  $\alpha$ -crystalline-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Macromol.* **22**: 151-162

**Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A., Nover, L. (2000).** The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* **12**: 265-278

**Dworetzky, S.I., Lanford, R.E., Feldherr, C.M. (1988).** The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *J. Cell Biol.* **107**: 1279-1287

**Ehrnsperger, M., Buchner, J., Gaestel, M. (1997a).** Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins (Fink, A.L. and Goto, Y. editors) Marcel Dekker, New York pp. 533-575

**Ehrnsperger, M., Gräbner, S., Gaestel, M., Buchner, J. (1997b).** Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**: 221-229

**Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M., Buchner, J. (1999).** The dynamics of Hsp25 quaternary structure-structure and function of different oligomeric species. *J. Biol. Chem.* **274**: 14867-14874

**Farkas, T., Kutsikova, Y.A., Zimarino, V. (1998).** Intramolecular repression of mouse heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 906-918

**Feder, M.E., Hofmann, G.E. (1999).** Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243-282

**Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., Lührmann, R. (1995).** The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483

**Flick, K.E., Gonzalez, L., Harrison, C.J., Nelson, H.C.M. (1994).** Yeast heat shock transcription factor contains a flexible linker between the DNA-binding domain and trimerization-domains-implications for DNA-binding by trimeric proteins. *J. Biol. Chem.* **269**: 12475-12481

**Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W. (1997a).** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**: 1051-1060

**Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Fransen, J., Grosveld, G. (1997b).** The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**: 807-816

**Forreiter, C., Kirschner, M., Nover, L. (1997).** Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*. *Plant Cell* **9**: 2171-2181

**Forreiter, C., Nover, L. (1998).** Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *J. Biosci.* **4**: 287-302

**Fridell, R.A., Fischer, U., Luhrmann, R., Meyer, B.E., Meinkoth, J.L., Malim, M.H., Cullen, B.R. (1996).** Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2936-2940

**Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., Nishida, E. (1996).** Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **271**: 20024-20028

**Galigniana, M.D., Scruggs, J.L., Herrington, J., Welsh, M.J., Carter-Su, C., Housley, P.R., Pratt, W.B. (1998).** Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1903-1913

**Gamborg, O.L., Phillips, G.C. (Eds.) (1995).** Plant cell, tissue and organ culture-fundamental methods. *Springer-Verlag*. Berlin, Heidelberg: 239-242

**Gaubatz, S., Lees, J.A., Lindeman, G.J., Livingston, D.M. (2001).** E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1384-1392

**Gething, M.J. (1997).** Guidebook to molecular chaperones and protein folding catalysts. Oxford, UK: Oxford Univ. press

**Giannakakou, P., Sackett, D.L., Ward, Y., Webster, K.R., Blagosklonny, M.V., Fojo, T. (2000).** p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell Biol.* **10**: 709-717

**Görlich, D., Mattaj, I.W. (1996).** Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**: 1513-1518

**Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., Izaurralde, E. (1997).** A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* **138**: 65-80

**Görlich, D., Kutay, U. (1999).** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 607-660

**Grant, C.M., Firoozan, M., Tuite, M.F. (1989).** Mistranslation induces the heat-shock response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **3**: 215-220

**Graw, J. (1997).** The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol. Chem.* **378**: 1331-1348

**Groenen, P.J., Merck, K.B., de Jong, W.W., Bloemendal, H. (1994).** Structure and modifications of the junior chaperone  $\alpha$ -crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur. J. Biochem.* **225**: 1-19

**Haasen, D., Köhler, C., Neuhaus, G., Merkle, T. (1999).** Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **20**: 695-705

**Haley, D.A., Horwitz, J., Steward, P.L. (1998).** The small heat shock protein,  $\alpha$ B-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **277**: 27-35

**Haley, D.A., Bova, M.P., Huang, Q.-L., Mchaourab, H.S., Steward, P.L. (2000).** Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.* **298**: 261-272

**Hamamoto, T., Gunji, S., Tsuji, H., Beppu, T. (1983).** Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **36**: 639-645

**Harrison, C.J., Bohm, A.A., Nelson, H.C.M. (1994).** Crystal structure of the DNA binding domain of heat shock transcription factor. *Science*. **263**: 224-227

**Heerklotz, D., Doring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., Nover, L. (2001).** The Balance of Nuclear Import and Export Determines the Intracellular Distribution and Function of Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfA2. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1759-1768

**Hiromi, Y., Hotta Y. (1985).** Actin Gene mutations in *Drosophila*; Heat shock activation in the direct flight muscles. *EMBO J.* **4**: 1681-1687

**Holaska, J.M., Black, B.E., Love, D.C., Hanover, J.A., Leszyk, J., Paschal, B.M. (2001).** Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* **152**: 127-140

**Hood, J.K., Silver, P.A. (1998).** Cse1p is required for export of Srp1p/importin- $\alpha$  from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 35142-35146

**Hoshino, H., Kobayashi, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., Hayashi, N., Yamamoto, M., Igarashi, K. (2000).** Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. *J. Biol. Chem.* **275**: 15370-15376

**Johnson, G.D., Davidson, R.S., McNamee, K.C., Russell, G., Goodwin, D., Holborow, E.J. (1982).** Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J. Immunol. Methods* **55**: 231-242

**Kaffman, A., Rank, N.M., O'Shea, E.K. (1998a).** Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* **12**: 2673-2683

**Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., Huang, L.S., O'Shea, E.K. (1998b).** The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**: 482-486

**Kedersha, N.L., Gupta, M., Miller, I., Anderson, P. (1999).** RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 $\alpha$  to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**: 1431-1442

**Kimpel, J.A., Key, J. (1985).** Heat shock in plants. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 353-357

**Kirschner, M., Winkelhaus, S., Thierfelder, J.M., Nover, L. (2000).** Transient expression and heat stress induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat stress proteins in tobacco protoplasts. *Plant J.* **24**: 397-411

**Kline, M.P., Morimoto, R.I. (1997).** Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2107-2115

**Komeili, A., O'Shea, E.K. (2000).** Nuclear transport and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 355-360

**Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.I., Schilperoort, R.A. (1982).** *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**: 72-74

**Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., Yoshida, M. (1998)** Leptomycin B Inhibition of Signal-Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1. *Exp. Cell. Res.* **242**: 540-547

**Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1999).** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9112-9117

**Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Görlich, D. (1997).** Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-1071

**Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., Görlich, D. (1998).** Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1**: 359-369

**Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

**Langanger, G., De Mey, J., Adam, H. (1983).** 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO) retards the fading of immunofluorescence preparations. *Mikroskopie* **40**: 237-241

**Langford, G.M. (1995).** Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 82-88

**Laskey, R.A., Honda, B.M., Finch, J.T. (1978).** Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**: 416-420

**Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., Landry, J. (1993a).** Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**: 24210-24214

**Lavoie, J.N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R.M., Landry, J. (1993b).** Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J. Biol. Chem.* **268**: 3420-3429

**Liang, P., McRae, T.H. (1997).** Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110**: 1431-1440

**Liang, S.H., Clarke, M.F. (1999).** A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **274**: 32699-32703

**Lindquist, S. (1981).** Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature* **293**: 311-314

**Liu, X.D., Liu, P.C., Santoro, N., Thiele, D.J. (1997).** Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J.* **16**: 6466-6477

**Lyck, R., Harmening, U., Höhfeld, I., Treuter, E., Scharf, K.-D., Nover, L. (1997).** Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**: 117-125

**MacRae, T.H. (2000).** Structure and function of small heat shock/ $\alpha$ -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 899-913

**Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A. (1999).** Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnol.* **17**: 969-973

**McBride, K.M., McDonald, C., Reich, N.C. (2000).** Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* **19**: 6196-6206

**McKenzie, S.L., Meselson, M. (1977).** Translation *in vitro* of *Drosophila* heat-shock messages. *J. Mol. Biol.* **117**: 279-283

**Merck, K.B., Groenen, P.J.T.A., Voorter, C.E.M., de Haard-Hoekman, W.A., Horwitz, J., Blomendal, H., de Jong, W.W. (1993).** Structural and functional similarities of bovine  $\alpha$ -crystallin and mouse small heat-shock protein-a family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1052



**Michael, W.M., Choi, M., Dreyfuss, G. (1995).** A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**: 415-422

**Michael, W.M., Eder, P.S., Dreyfuss, G. (1997).** The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* **16**: 3587-3598

**Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., Peters, R. (1997).** The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* **14**: 1407-1417

**Mifflin, L.C., Cohen, R.E. (1994).** Characterization of denatured protein inducers of heat shock (stress) response in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 15710-15717

**Moore, M.S. (1998).** Ran and nuclear transport. *J. Biol. Chem.* **273**: 22857-22860

**Morimoto, R.I. (1998).** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**: 3788-3796

**Mosser, D.D., Duchaine, J., Massie, B. (1993).** The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated *in vivo* by hsp70. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5427-5438

**Nakielny, S., Dreyfuss, G. (1999).** Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* **99**: 677-690

**Neumann, D., zur Nieden, U., Manteuffel, R., Walter, G., Scharf K.-D., Nover, L. (1987).** Intracellular localization of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Cell Biol.* **43**: 71-78

**Neufeld, K.L., Nix, D.A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M.C., Cullen, B.R., White, R.L. (2000).** Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12085-12090

**Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I., Rosbash, M. (1997).** The importin-beta family member Crm-1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr. Biol.* **7**: 767-775

**Neville, M., Rosbash, M. (1999).** The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **18**: 3746-56

**Newton, E.M., Knauf, U., Green, M., Kingston, R.E. (1996).** The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 839-846

**Nicholl, I.D., Quinlan, R.A. (1994).** Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J.* **13**: 945-953

**Nigg, E.A. (1997).** Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**: 779-87

**Nover, L. (1990).** Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort. *Naturwissenschaften* **77**: 310-316

**Nover, L. (Ed.) (1991).** Heat-shock-response. *CRC-Press*, Boca Raton

**Nover, L., Scharf, K.-D. (1997).** Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 80-103

**Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S., Ganguli, A., Scharf, K.-D. (2001).** *Arabidopsis* and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chap.* in press

**Nover, L., Scharf, K.-D., Neumann, D. (1983).** Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **34**: 254-264

**Nover, L., Scharf, K.-D., Neumann, D. (1989).** Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1298-1308

**Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E., Gurley, W.B. (1996).** The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chap.1*: 215-23

**Ohno, M., Fornerod, M., Mattaj, I.W. (1998).** Nucleocytoplasmic Transport: The last 200 nanometers. *Cell* **92**: 327-336

**Oshima, Y. (1997).** The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **72**: 323-34

**Panté, N., Aebi, U. (1996).** Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **31**: 153-199

**Peteranderl, R., Nelson, H.C.M. (1992).** Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochem.* **31**: 12272-12276

**Petit, M.M., Fradelizi, J., Golsteyn, R.M., Ayoubi, T.A., Menichi, B., Louvard, D., Van de Ven, W.J., Friederich, E. (2000).** LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol. Biol. Cell* **11**: 117-129

**Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992).** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233

**Pröls, M., Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1988).** Transient gene expression in tobacco protoplasts: I. time course of CAT appearance. *Plant Cell Rep.* **7**: 221-224

**Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., Wu, C. (1993).** Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**: 230-234

**Radu, A., Moore, M.S., Blobel, G. (1995).** The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* **81**: 215-222

**Rao, C.M., Raman, B., Ramakrishna, T., Rajaraman, K., Ghosh, D., Datta, S. (1998).** Structural perturbation of  $\alpha$ -crystallin and its chaperone-like activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**: 271-281

**Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B., Maas, C. (1996).** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequora victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1495-1499

**Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L. Jr., Jarnik, M., Engel, A., Aebi, U. (1990).** Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* **110**: 883-894

**Renkawek, K., de Jong, W.W., Merck, K.B., Frenken, C.W., van Workum, F.P., Bosman, G.J. (1992).**  $\alpha$ B-Crystallin is present in reactive glia in Creutzfeld-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* **83**: 324-327

**Renkawek, K., Voorter, C.E., Bosman, G.J., van Workum, F.P., de Jong, W.W. (1994).** Expression  $\alpha$ B-Crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **87**:155-160

**Ribbeck, K., Görlich, D. (2001).** Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20**: 1320-1330

**Ritossa, F.M. (1962).** A new puffing pattern induced by a temperature heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573

**Ryan, K.J., Wente, S.R. (2000).** The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 361-371

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, New York/USA

**Scharf, K.D., Materna, T., Treuter, E., Nover, L. (1994).** Heat stress promoters and transcription factors. *Results Probl. Cell Differ.* **20**: 125-162

**Scharf, K.-D., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., Nover, L. (1998a).** The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2240-2251

**Scharf, K.-D., Höhfeld, I., Nover, L. (1998b).** Heat stress response and heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **4**: 313-329

**Scharf, K.-D., Siddique, M., Vierling, E. (2001).** The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins (sHsps) and a new family of proteins containing  $\alpha$ -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chap.* in press

**Schlesinger, M.J. (1990).** Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **265**: 12111-12114

**Schöffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M.W., Angermüller, S. (1989).** The function of heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 246-253

**Schöffl, F., Prändl, R., Reindl, A. (1998).** Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* **117**: 1135-1141

**Schultheiss J., Kunert O., Gase U., Scharf K.-D., Nover L., Rüterjans H. (1996).** Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. *Eur. J. Biochem.* **236**: 911-921

**Sharma, K.K., Kumar, G.S., Murphy, A.S., Kester, K. (1998).** Identification of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *J. Biol. Chem.* **273**: 15474-15478

**Shi, Y., Mosser, D.D., Morimoto. R.I. (1998).** Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* **12**: 654-666

**Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962).** *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-239

**Siomi, H., Dreyfuss, G. (1995).** A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* **129**: 551-60

**Smulders, R.H., de Jong, W.W. (1997).** The hydrophobic probe 4,4'-bis(1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid) is specifically photoincorporated into the N-terminal domain of alpha B-crystallin. *FEBS Lett.* **409**: 101-104

**Sorger, P.K., Nelson, H.C.M. (1989).** Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* **59**: 807-813

**Stochaj, U., Rassadi, R., Chiu, J. (2000).** Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p. *FASEB J.* **14**: 2130-2132

**Stoffler, D., Goldie, K.N., Aebi, U. (1999).** Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **287**: 741-752

**Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M. (1999).** A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**: 1660-1672

**Sullivan, K.F., Kay, S.A., (Editors) (1999).** Green Fluorescent Proteins. *Methods in Cell Biology*, Volume **58**

**Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J.E., Whitaker, L.L., McElroy, A.K., Wang, J.Y., Hope, T.J. (1998).** Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7457-7462

**Tissieres, A., Mitchel, H.K., Tracy, U.M. (1974).** Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**: 389-398

**Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1988).** Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8725

**Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., Nishida, E. (1998).** Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G<sub>2</sub> checkpoint. *EMBO J.* **17**: 2728-2735

**Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., Scharf, K.-D. (1993).** Promotor specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors in tomato. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 113-125

**Turpin, P., Ossareh-Nazari, B., Dargemont, C. (1999).** Nuclear transport and transcriptional regulation. *FEBS Lett.* **452**: 82-86

**van Noort, J.M. (1996).** Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J. Mol. Med.* **74**: 285-296

**Vierling, E. (1997).** The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *ACTA Physiol. Planta* **19**: 539-547

**Vousden, K.H., Woude, G.F. (2000).** The ins and outs of p53. *Nat. Cell Biol.* **2**: 709-711

**Vuister, G.W., Kim, S.-J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., Bax, A. (1994).** Solution structure of the DNA binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nature Struct. Biol.* **1**: 605-614

**Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M., Nishida, E. (1998).** Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* **17**: 1635-1641

**Ward, B.M., Lazarowitz, S.G. (1999).** Nuclear Export in Plants: Use of Geminivirus Movement Proteins for a Cell-Based Export Assay. *Plant Cell* **11**: 1267-1276

**Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., Nishida, E. (2000).** Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Reports* **1**: 176-182

**Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. (1996).** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **296**: 325-338

**Waters, E.R., Vierling, E. (1999).** The diversification of plant cytosolic small heat stress proteins preceded the divergence of mosses. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 127-139

**Wehmeyer, N., Vierling, E. (2000).** The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **122**: 1099-1108



**Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S. (1995).** Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J. Cell Sci.* **108** (Pt 2): 545-555

**Weis, K. (1998).** Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *TIBS* **23**: 185-189

**Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S. (1995).** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473

**Williams, G. T., McClanahan, T.K., Morimoto, R.I. (1989).** E1a transactivation of the human *HSP70* promoter is mediated through the basal transcriptional complex. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2574-2587

**Wisniewski, J., Orosz, A., Allada, R., Wu, C. (1996).** The C-terminal region of *Drosophila* heat shock factor (HSF) contains a constitutively functional transactivation domain. *Nucleic Acids Res.* **24**: 367-374

**Wolff, B., Sanglier, J.J., Wang, Y. (1997).** Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**: 139-147

**Wu, C. (1995).** Heat stress transcription factors. *Annu. Rev. Cell Biol.* **11**: 441-469

**Yang, Q., Rout, M.P., Akey, C. (1998).** Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* **1**: 223-234

**Zhong, M., Orosz, A., Wu, C. (1998).** Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol. Cell* **2**: 101-108

**Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., McKeon, F. (1998).** Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**: 851-861

**Zhu, J., McKeon, F. (1999).** NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* **398**: 256-260

**Zimarino, V., Wilson, S., Wu, C. (1990).** Antibody-mediated activation of *Drosophila* heat shock factor in vitro. *Science* **249**: 546-549

**Zuo, J., Baler, R., Dahl, G., Voellmy, R. (1994).** Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled coil structure. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7557-7568

## 6 Anhang

### 6.1 Primer- und Templatbindungssequenzen

#### pRTds-GFP-HsfA1, Sequenz in pBSE8LS

---

5' Sequenz:

**SacI**

>5'-**GAGCTGAGCTC** TTA CAG CCG GCG C>(Pr352F)  
 698-GAGCTCCGATG TTA CAG CCG GCG CCG GCG CCG ATG CCC-735

M L Q P A P A P M P

3' Sequenz:

**NdeI**

2195- ATA TCA AAC AAC AAA AAC ATA TGA TCTAATCTCTATATGATA  
 I S N N K N I \*

**XbaI**

<**CATCAAAGATCTGATCACCCCG**-5'<(Pr353R)  
 TATGTACACAAATGTTAATTATGGTAGTTTCTTGACTAGTGGGGGC-2282

#### pEGFP-C1 HsfA2, Sequenz in pRT-HsfA2

---

5' Sequenz:

**HindIII**

>5'-**CCGGCCGCAAGCTTCC** GAG GAT GTA ATG>(Pr390F)  
 464-CCGGCCGCAAGTAATG GAG GAT GTA ATG AAA GTG AAG-500

M E D V M K V K

3' Sequenz:

1473-AAA ACA CCT GAA TGG GGT GAG GAA TTA CAA GAC CTT GTA  
 K T P E W G E E L Q D L V

**Asp718I**

<**GAA CCA AAG GAA ATCTCCATGGAGAACAC**-5'<(Pr391R)  
 GAT CAA CTT GGT TTC CTT TAGAGATCACTCTTGTGTTCCCCTGGCCT-1558

D Q L G F L \*

## pDsRed-N1 HsfA2 und pECFP-N1 HsfA2, Sequenz in pRT-HsfA2

---

5' Sequenz:

>5'-**GACGCACAATCCCACTATCC**> (Pr270F)

371-GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTC

XhoI                      SacI

ATTTCAATTTGGAGAGGACCTCGAGAATTTCGAGCTCGGTACCCGGCCGCAAGTA

**ATG** GAG GAT GTA ATG AAA GTG AAG-500

M E D V M K V K

3' Sequenz:

1476-ACA CCT GAA TGG GGT GAG GAA TTA CAA GAC CTT GTA GAT  
T P E W G E E L Q D L V D

ApaI

<**CCA AAG GAA CGC TCTACCCGGGACACAAGGG**-5'> (Pr654R)

CAA CTT GGT TTC CTT TAG AGATCACTCTTGTGTTCCTCC-1551

Q L G F L \*

## p-luc Hsp17

---

5' Sequenz:

Asp718I

>5'-**GGCCTGGTACCCAATCCTAACC**> (Pr587F)

49-CCCCTGGTAGACCAATCCTAACCAATGTCTGGTTAAGATGGTCCAATCCC-102

3' Sequenz:

400-TTA CGT CCT GTA GAA ACC CCA ACC CGT GAA ATC AAA AAA  
L R P V E T P T R E I K K

<**C CGT AAG TCA GAC CTA GCG CTT**-5'> (Pr285)

CTC GAC GGC CTG TGG GCA TTC AGT CTG GAT CGC GAA-477

L D G L W A F S L D R E

## p-luc Hsp17\*

---

5' Sequenz:

Asp718I

>5'-**CAAGCTTGGTACCGTCGAAGAAGTC**> (Pr585F)

4980-CAAGCTTGGATCCGTCGAAGAAGTCCAGAATGTTTCTGAAAGTTTCAGAAA

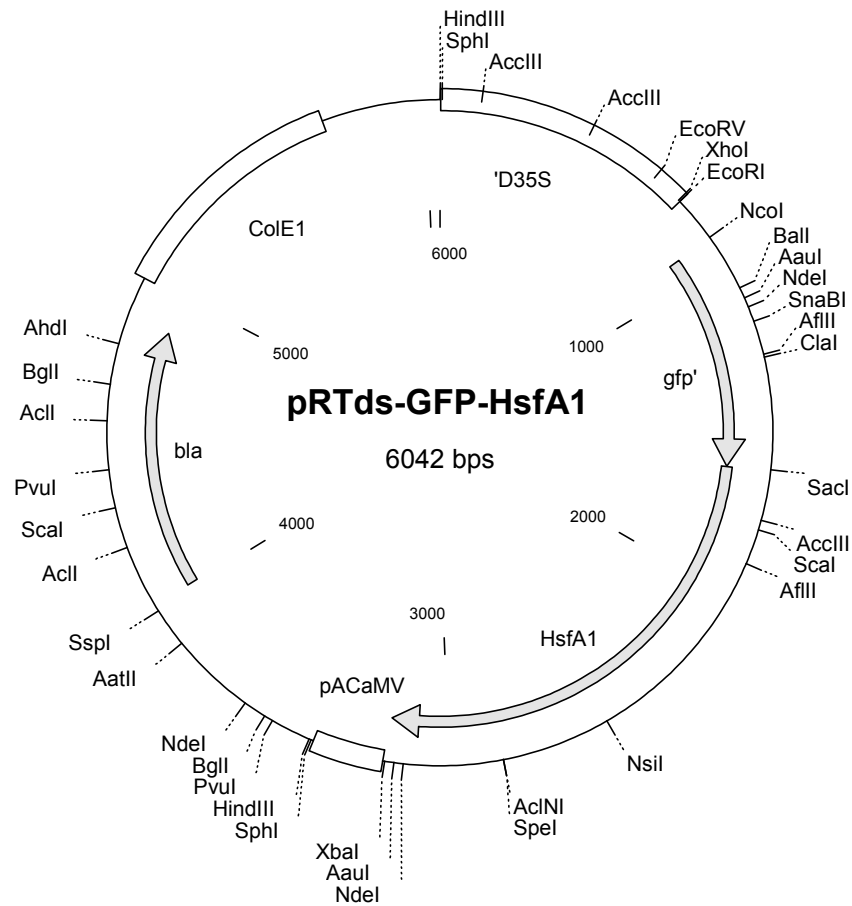
3' Sequenz:

SmaI

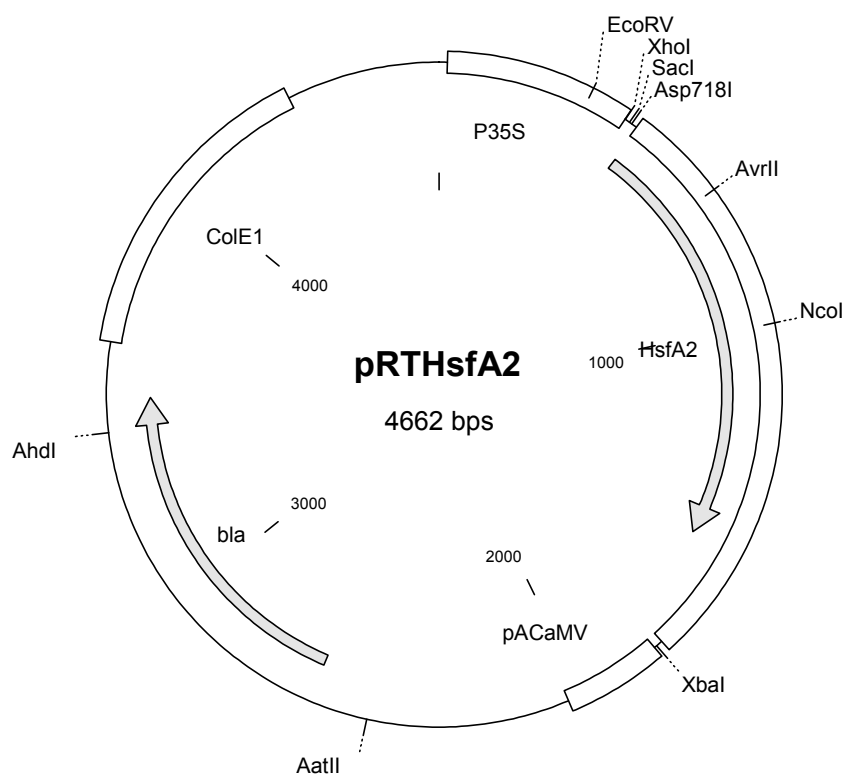
<**CCTCTCCTGGGCGCTCACC**GG-5'> (Pr586R)

ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTGGCC-192

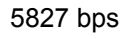
## 6.2 Plasmidkarten



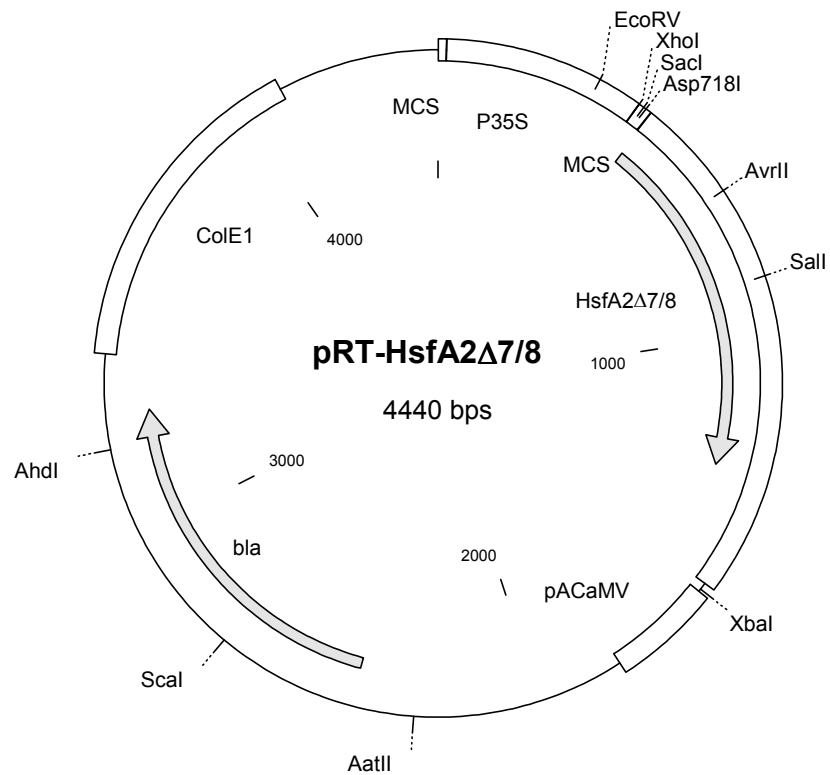
Insert:	GFP-Lp-HsfA1					No.:	DH57
Cloning Vector:	pRTdS-GFP						
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>		
2.	Plant cells				Lp-HsfA1 (aa24-527)		
Used for:		Expression of plant optimized GFPxLp-HsfA1 (aa24-527) in plant cells					
Remarks:		PCR amplification of HsfA1 from pBSEHsfA1 with Pr.351F(SacI) and Pr.353R(XbaI) cloning of SacI/XbaI cassette into pRTds-GFP SacI/XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



Insert:	HsfA2				No.:	ET 345, 391, 875
Cloning Vector:	pRT101 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)					
Host Organisms:					Functional Markers:	
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>	
2.	Plant cells				Lp-HsfA2 (aa1-351)	
Used for:		Expression of Lp-HsfA2 (aa1-351) in plant cells				
Remarks:		Fusion of pHSFT30/NotI-BamHI with OHSFT305/BamHI-NotI, NotI filled in, subcloned into pRT101/SmaI				
Constructed by/obtained from:			E. Treuter			Date:
Reference:	Treuter et al. MGG 240(93)113				Sequencing:	ok

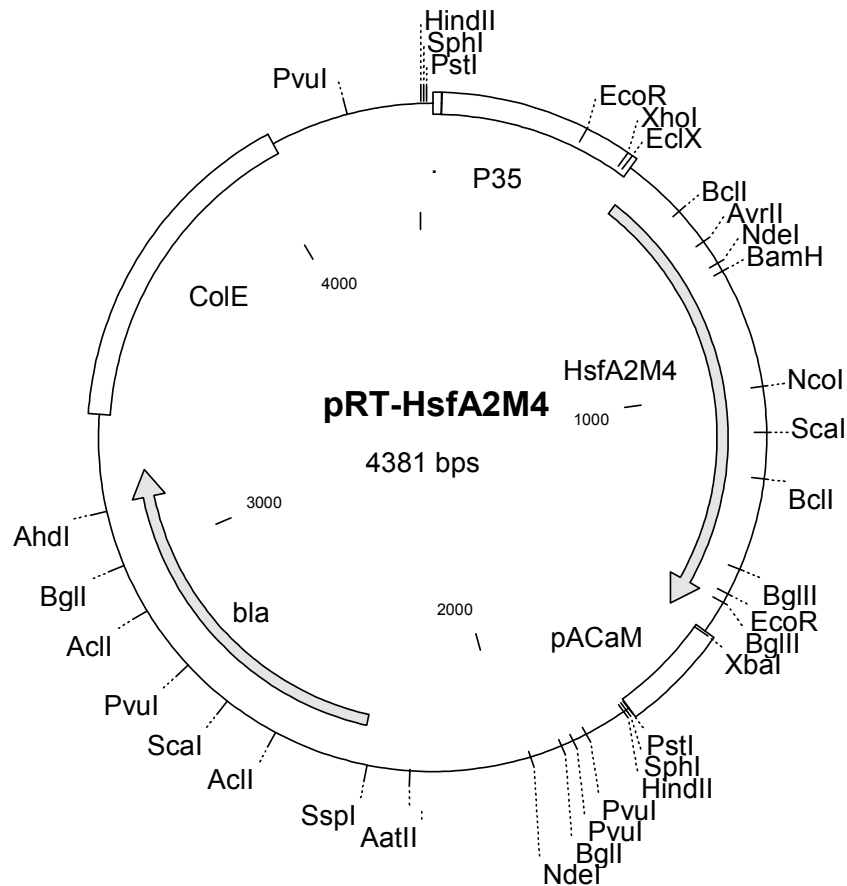


Insert:	GFP-Lp-HsfA2				No.:	DH49
Cloning Vector:	pRTdS-GFP					
Host Organisms:				Functional Markers:		
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup>			
2.	Plant cells		Lp-HsfA2 (aa1-351)			
Used for:	Expression of plant optimized GFPxLp-HsfA2 (aa1-351) in plant cells					
Remarks:	Cloning of SacI/XbaI fragment from pRT-HsfA2 into pRTdS-GFP SacI/XbaI					
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz			Date:	06/99
Reference:	Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:		ok

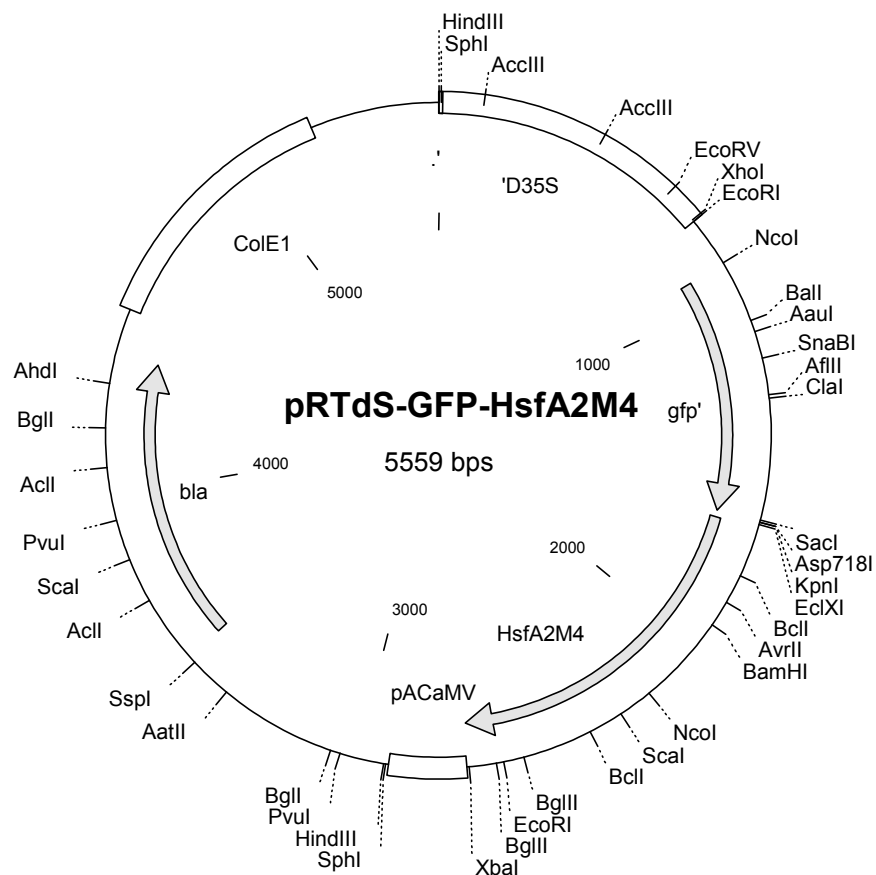


Insert:		Lp-HsfA2Δ7/8			No.:		ET738/9			
Cloning Vector:					pRT101 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)					
Host Organisms:					Functional Markers:					
1.	E. coli					Amp <sup>r</sup>				
2.	Plant cells					HsfA2Δ7-8 (aa1-136,VD,213-351); Sall site (aa137/138)				
Remarks:		Introduction of Sall by site directed mutagenesis in pBSE30S, recloning via XhoI-XbaI into pRT101; deletion of HR-A/B region between aa136 and 213								
Constructed by/obtained from:				E. Treuter			Date:		06/99	
Reference:		Promotion E. Treuter; Heerklotz et al., 2001				Sequencing:		WS 120/2+3		

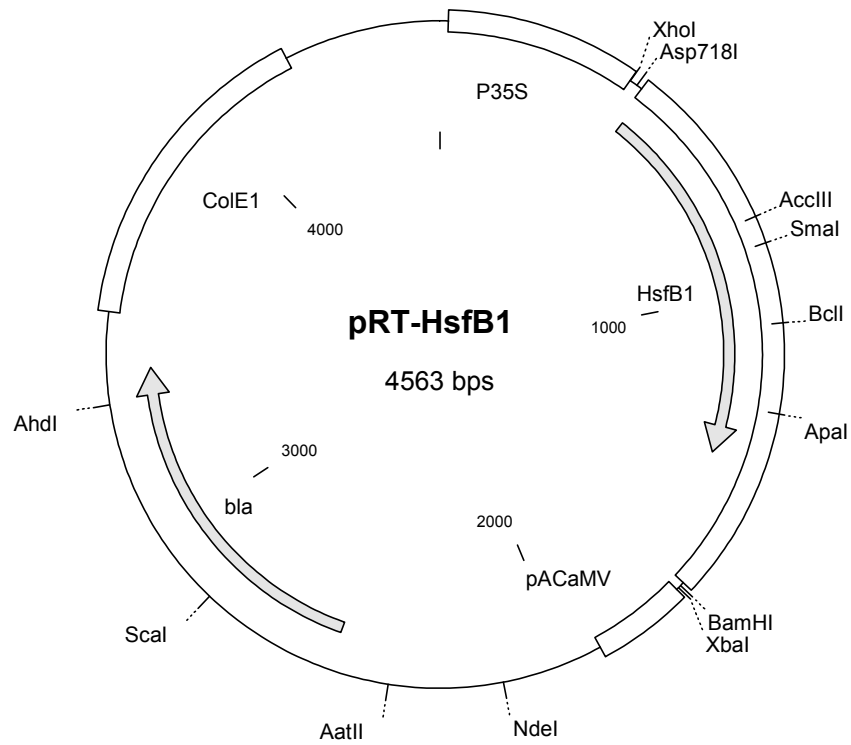




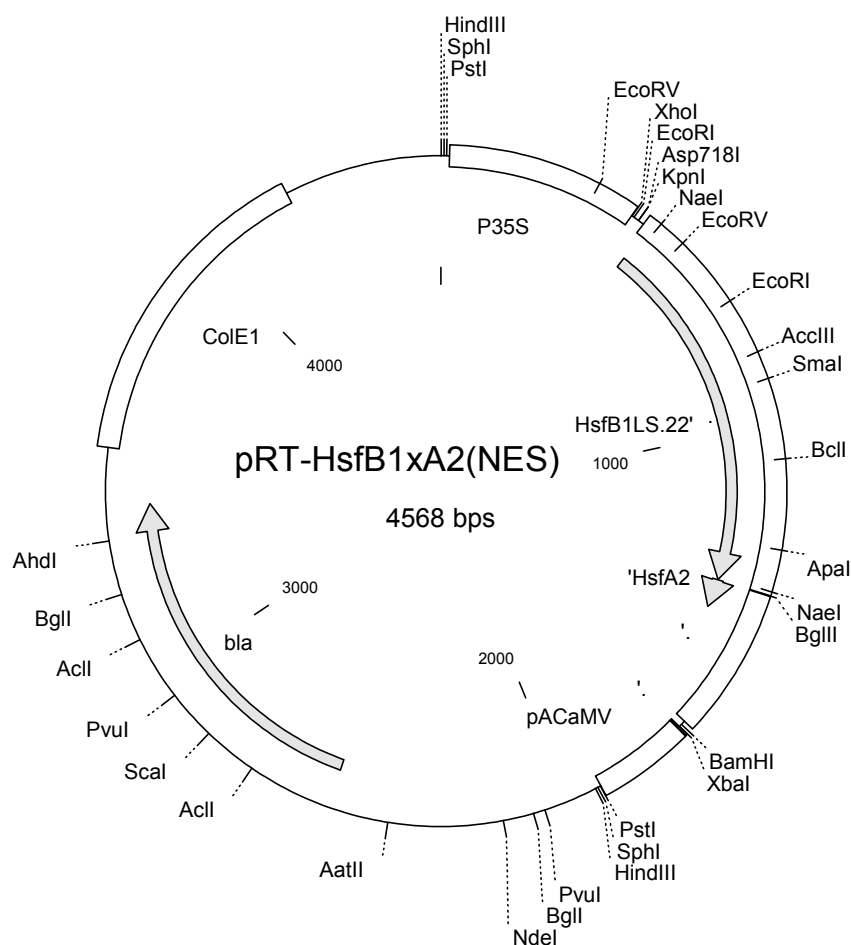
Insert:	Lp-HsfA2M4			No.:	PD145
Cloning Vector:	pRT104 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup>		
2.	Plant cells		Lp-HsfA2M4 (aa1-351; L344A, L348A, L351A)		
Used for:	Expression of Lp-HsfA2M4(aa1-351; L344A, L348A, L351A) in plant cells				
Remarks:	PCR amplification of HsfA2 from pRTHsfA2 with Pr.333F and Pr.339R (L344,L348,L351>AAA and stop codon and XbaI site); cloning of XhoI/XbaI cassette into pRTHsfA2ΔC323 XhoI/XbaI				
Constructed by/obtained from:		P. Döring		Date:	04/99
Reference:	Labjournal P. Döring; Heerklotz et al., 2001			Sequencing:	ok



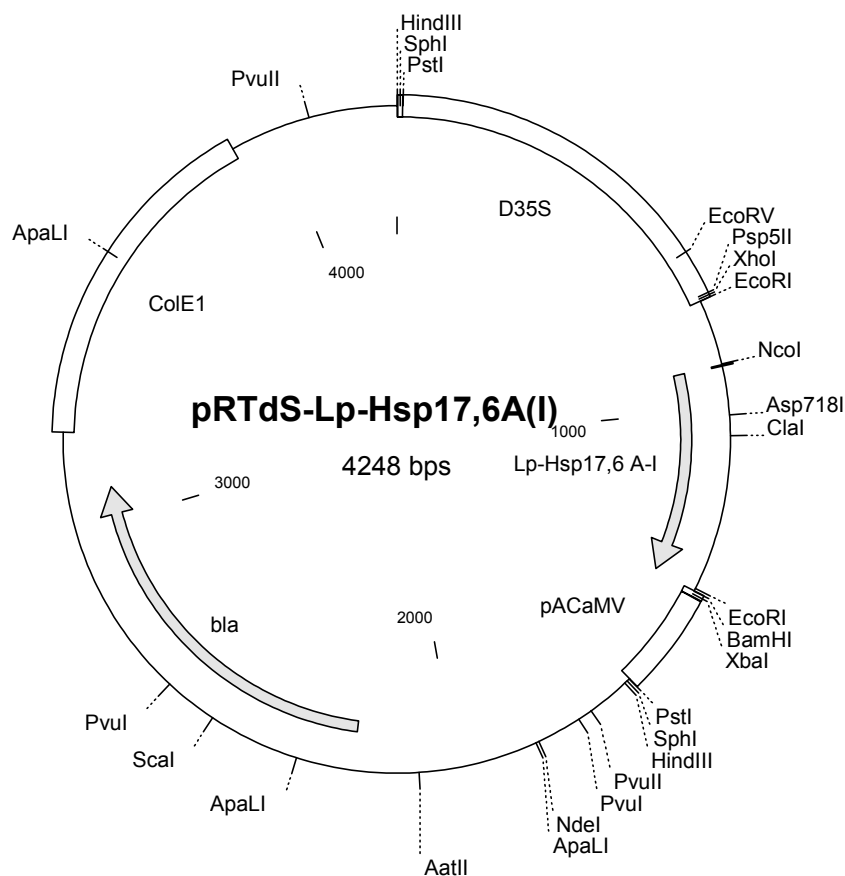
Insert:		GFP-Lp-HsfA2M4				No.:	DH57a
Cloning Vector:		pRTdS-GFP					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>		
2.	Plant cells				Lp-HsfA2M4 (aa1-351; L344A, L348A, L351A)		
Used for:		Expression of plant optimized GFPxLp-HsfA2M4(aa1-351; L344A, L348A, L351A) in plant cells					
Remarks:		Cloning of BamHI/XbaI fragment from pRTHsfA2M4 (PD145) into pRTdS-GFP-HsfA2 (DH49) cut BamHI/XbaI;					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	04/99
Reference:		Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:		ok



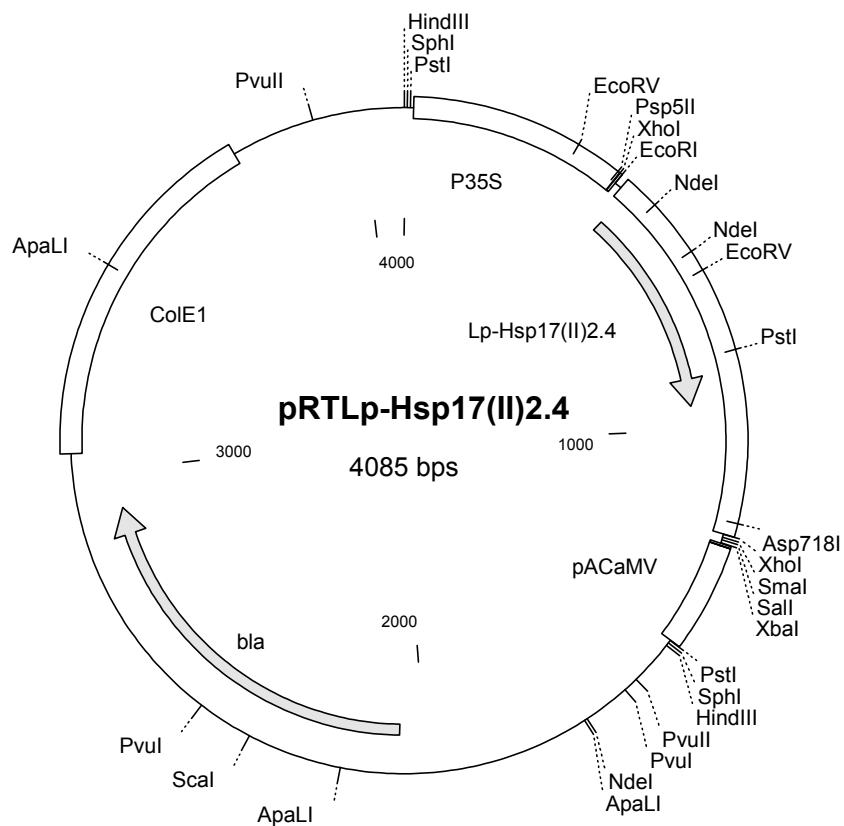
Insert:	Lp-HsfB1			No.:	ET205
Cloning Vector:	pRT101 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli			Amp <sup>r</sup>	
2.	Plant cells			Lp-HsfB1 (aa1-301)	
Used for:		Expression of Lp-HsfB1 (aa1-301) in plant cells			
Remarks:		Fusion of pHSFT37/NotI-EcoRI with OHSFT24/EcoRI-NotI, NotI sites filled in, subcloned into pRT101/SmaI			
Constructed by/obtained from:			E. Treuter		Date: 04/99
Reference:	Heerklotz et al., 2001; Treuter et al. MGG 240(93)113			Sequencing:	ok



Insert:		Lp-HsfB1.22xA2(NES)			No.:		PD183			
Cloning Vector:		pRT101 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)								
Host Organisms:					Functional Markers:					
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>					
2.	Plant cells				Lp-HsfB1.22xA2.Bgl(NES)					
Used for:		Expression of Lp-HsfB1xA2.Bgl(NES) fusion protein in plant cells								
Remarks:		Ligation of BglII/Xba fragment of pRTHsfA2 into Bgl/Xba cut pRTHsfB1.22								
Constructed by/obtained from:				P. Doering, D.Heerklotz			Date:		02/99	
Reference:		Heerklotz et al., 2001				Sequencing:		ok		

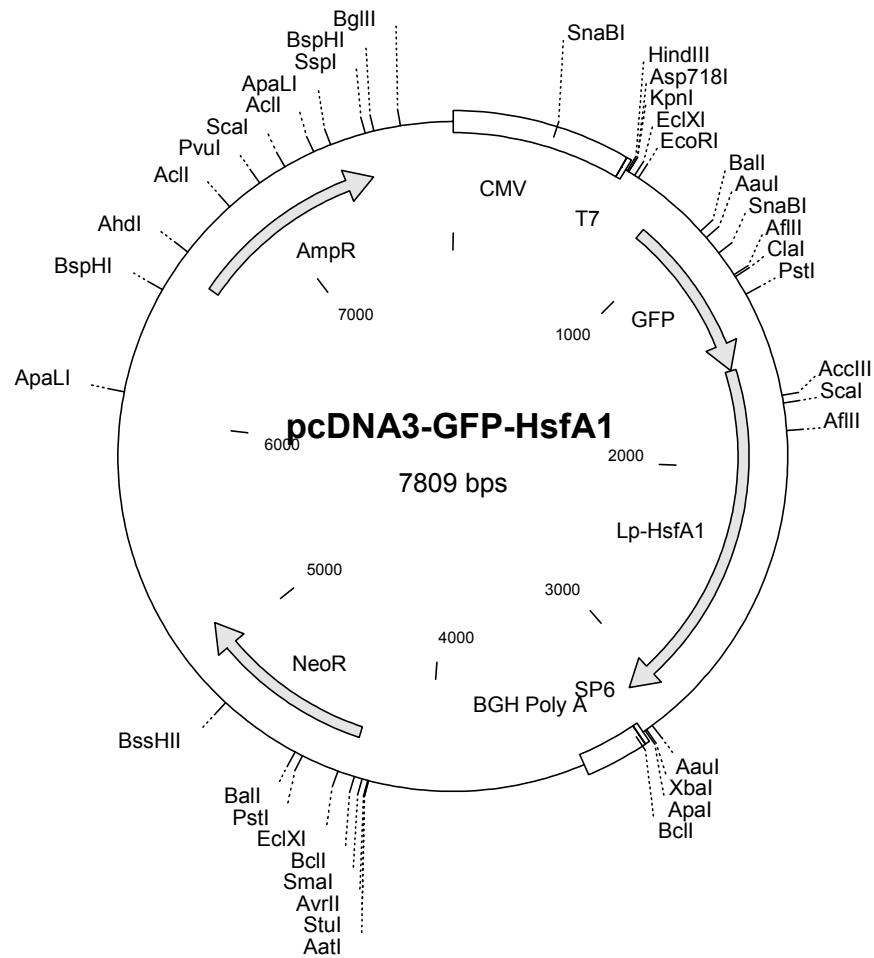


Insert:		Lp-Hsp17,6A(I)				No.:	DLII-2
Cloning Vector:		pRTds					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>		
2.	Plant cells				Lp-Hsp17,6A(I) (aa1-154)		
Used for:		Expression of Lp-Hsp17,6A(I) (aa1-154) in plant cells					
Remarks:		Subcloning of NcoI-XbaI fragment from pRT-Lp-Hsp17,6A(I) into pRTdS-GFP NcoI-XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Löw		Date:	
Reference:		Labjournal D. Löw			Sequencing:		ok



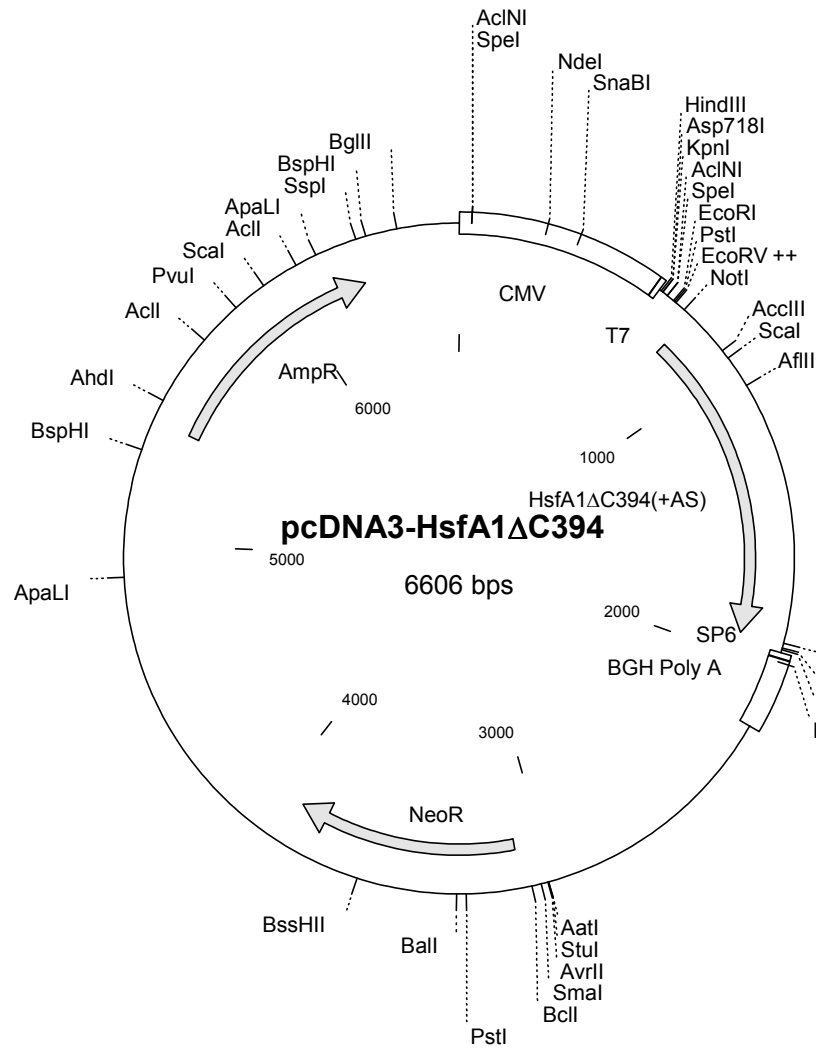
Insert:		Lp-Hsp17(II)2.4				No.:	MK29
Cloning Vector:		pRT104 (Töpfer et al. NAR 15(87)5890)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>		
2.	Plant cells				Lp-Hsp17(II)2.4 (aa1-155)		
Used for:		Expression of Lp-Hsp17(II)2.4 (aa1-155) in plant cells					
Remarks:		Subcloning of EcoRI/XbaI fragment from pAD 2.4 (AC) into pRT101					
Constructed by/obtained from:				M. Kirschner		Date:	08/99
Reference:		Labjournal M. Kirschner			Sequencing:		ok



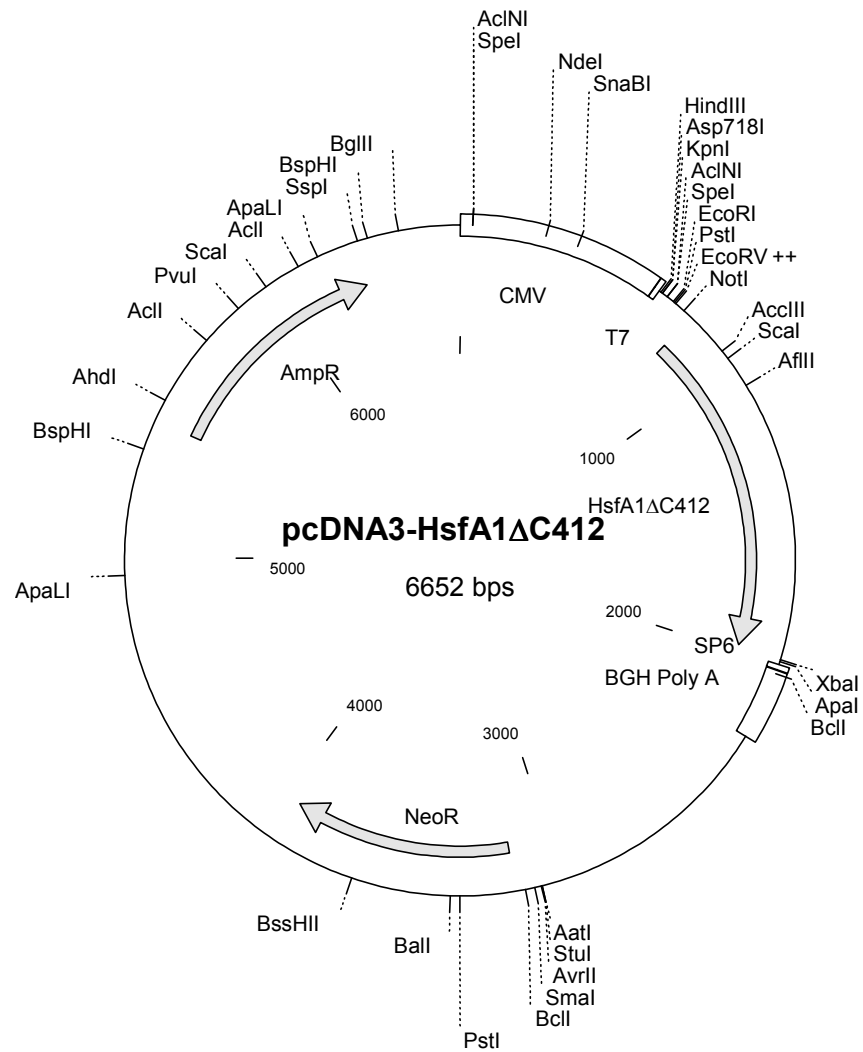


Insert:	GFP-HsfA1					No.:	DH56
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)						
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Lp-HsfA1 (aa25-527)		
Used for:		Expression of plant GFPxLp-HsfA1(aa25-527) in mammalian cells					
Remarks:		Cloning of EcoRI/XbaI fragment from pRTdS-GFP-Lp-HsfA1 (DH57) into pcDNA3 EcoI/XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok

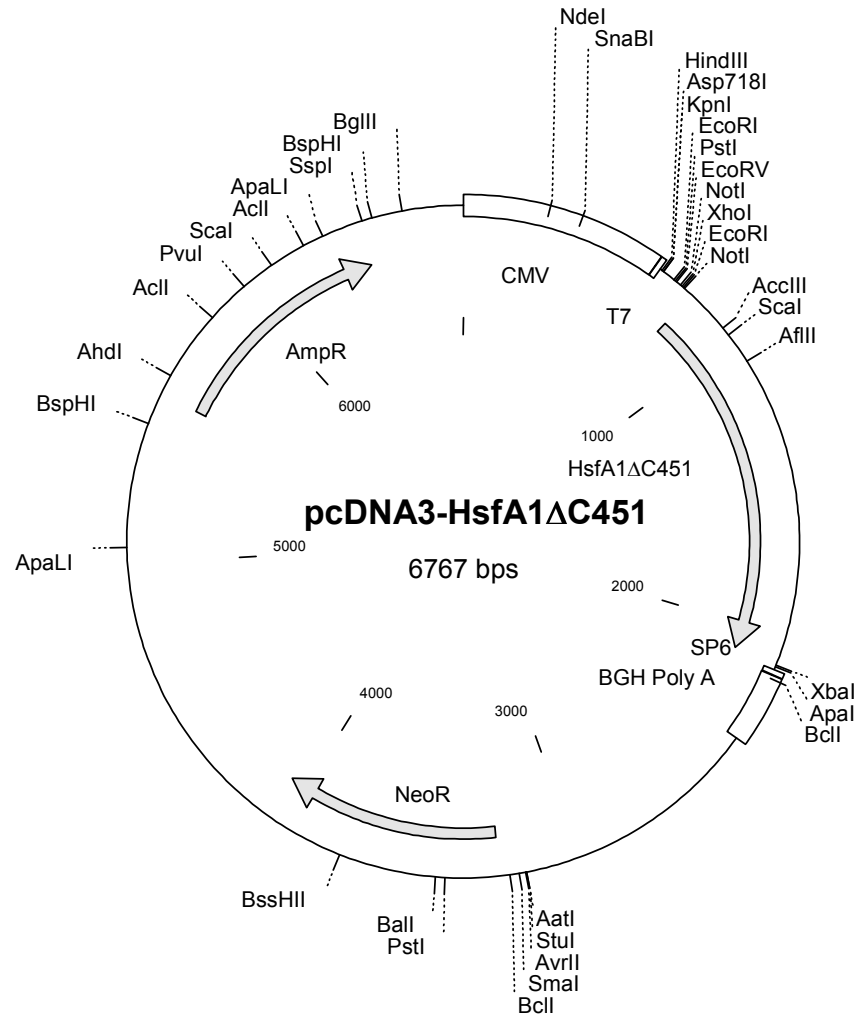




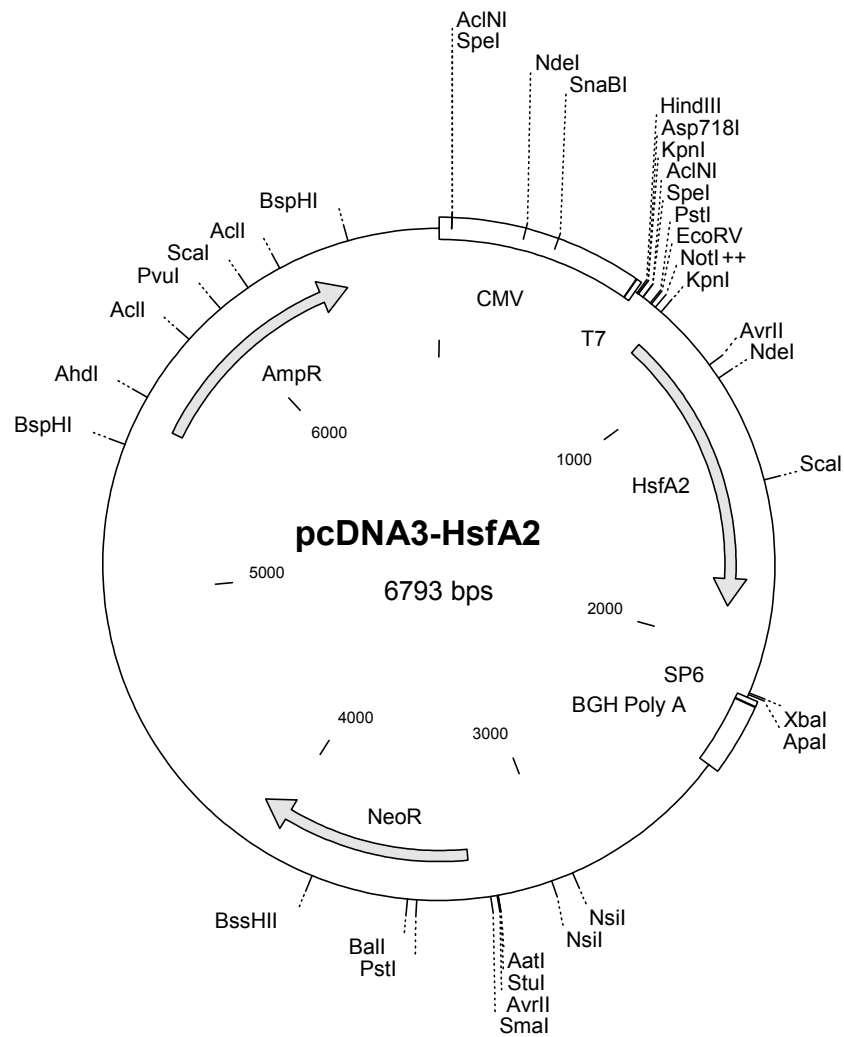
Insert:		Lp-HsfA1ΔC394				No.:	DH08
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Lp-HsfA1 (aa23-394+as)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA1 (aa23-394+as) in mammalian cells					
Remarks:		Cloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA1ΔC394 into pcDNA3 XhoI/XbaI					
Constructed by/obtained from:			D. Heerklotz			Date:	02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



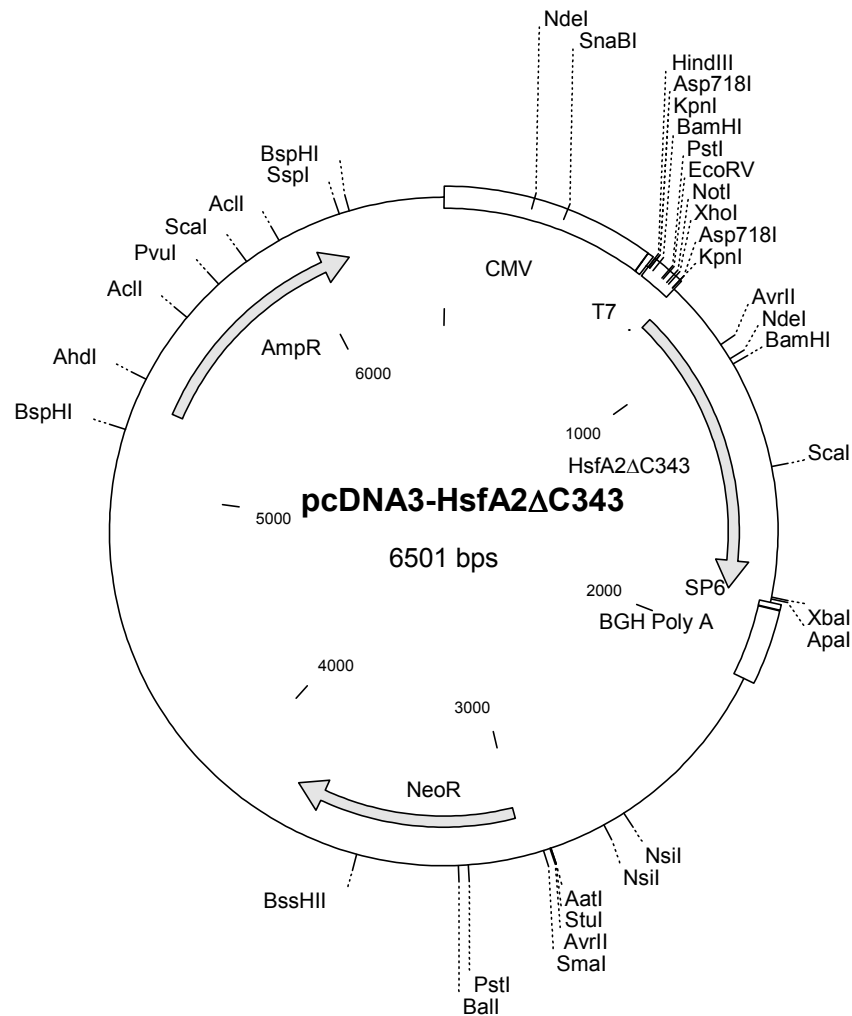
Insert:		Lp-HsfA1ΔC412					No.:	DH09
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)						
Host Organisms:					Functional Markers:			
1.	E. coli					Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells					Lp-HsfA1 (aa23-412+tdi)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA1 (aa23-412+tdi) in mammalian cells						
Remarks:		Cloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA1ΔC412 into pcDNA3 XhoI/XbaI						
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz			Date:	02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok	



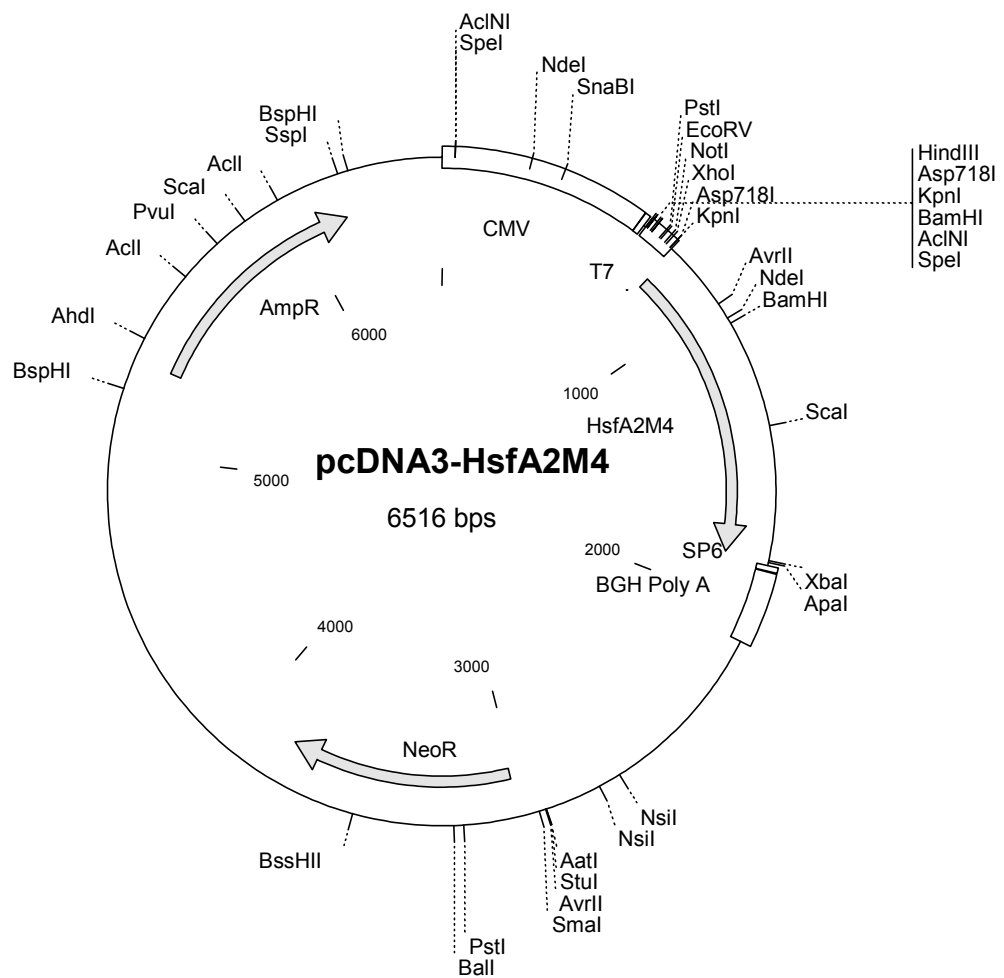
Insert:		Lp-HsfA1ΔC451			No.:		DH10	
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)						
Host Organisms:					Functional Markers:			
1.	E. coli					Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells					Lp-HsfA1 (aa23-451)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA1 (aa23-451) in mammalian cells						
Remarks:		Cloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA1ΔC451 into pcDNA3 XhoI/XbaI						
Constructed by/obtained from:			D. Heerklotz			Date:		02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok	



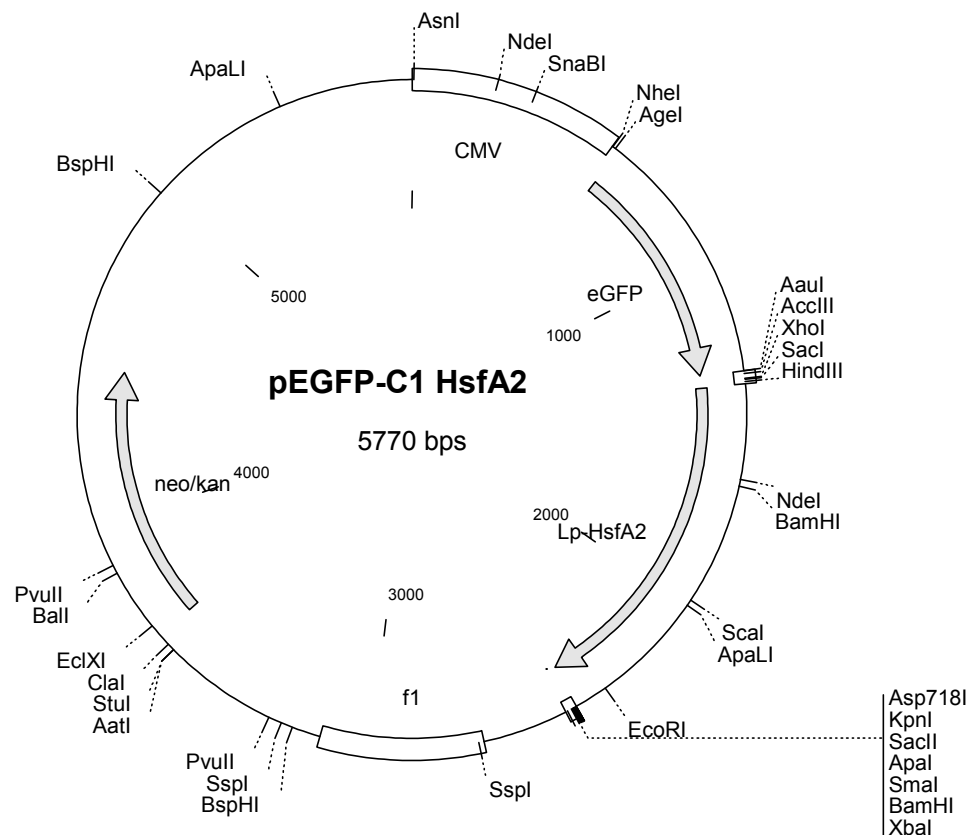
Insert:		Lp-HsfA2				No.:	DH03
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Lp-HsfA2 (aa1-351)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA2 (aa1-351) in mammalian cells					
Remarks:		Subcloning of XhoI/XbaI fragment from pBSE30 into pcDNA3 XhoI/XbaI					
Constructed by/obtained from:			D. Heerklotz			Date:	02/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



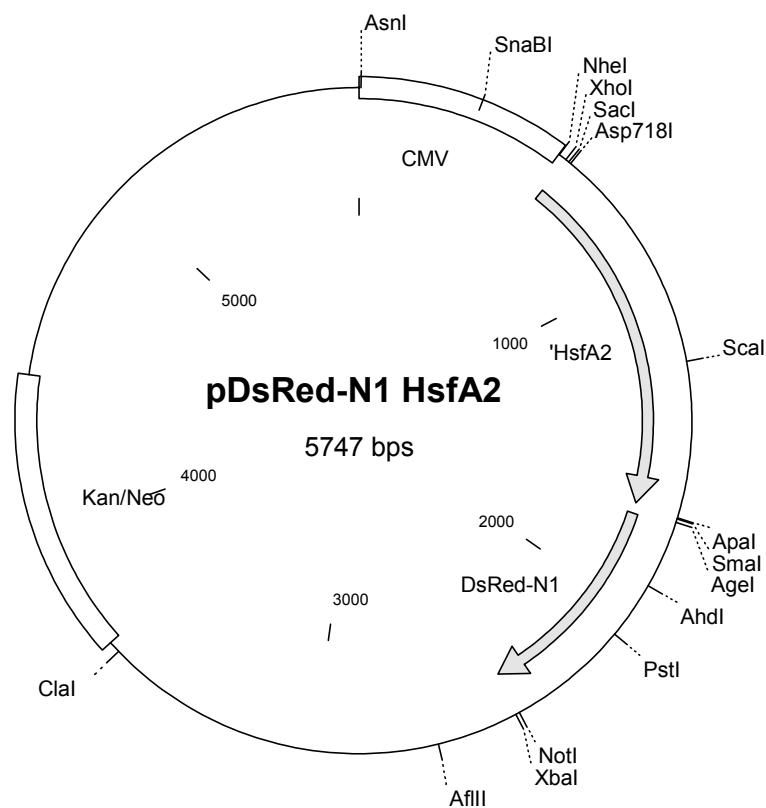
Insert:	Lp-HsfA2ΔC343			No.:	DH06
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells		Lp-HsfA2ΔC343 (aa 1-343)		
Used for:	Expression of Lp-HsfA2ΔC343 (aa 1-343) in mammalian cells				
Remarks:	Subcloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA2ΔC343 into pcDNA3 XhoI/XbaI				
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz		Date:	06/99
Reference:	Heerklotz et al., 2001			Sequencing:	ok



Insert:	Lp-HsfA2M4			No.:	DH18
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells		Lp-HsfA2M4		
Used for:	Expression of Lp-HsfA2M4 in mammalian cells				
Remarks:	Subcloning of XhoI/XbaI fragment from PD145 into pcDNA3, NES mutant XhoI/XbaI				
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz		Date:	06/99
Reference:	Heerklotz et al., 2001			Sequencing:	ok

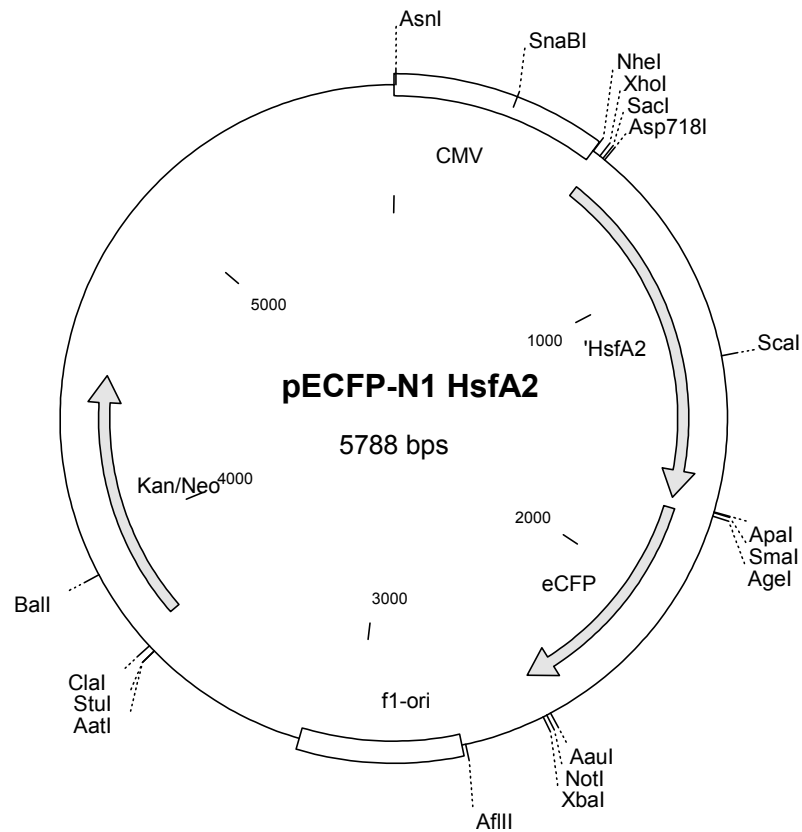


Insert:	Lp-HsfA2			No.:	DH25
Cloning Vector:	pEGFP-C1 (Clontech)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Neo <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells		GFPxHsfA2 fusion protein		
Used for:	Expression of N-terminally GFP-tagged Lp-HsfA2(aa2-351) in mammalian cells				
Remarks:	PCR amplification of HsfA2 from pRTHsfA2 with Pr.390F (HindIII) and Pr.391R (Asp718I); cloning of HindIII/Asp718I cassette into pEGFP-C1 vector (Clontech) HindIII/Asp718I				
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz		Date:	02/99
Reference:	Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:	ok



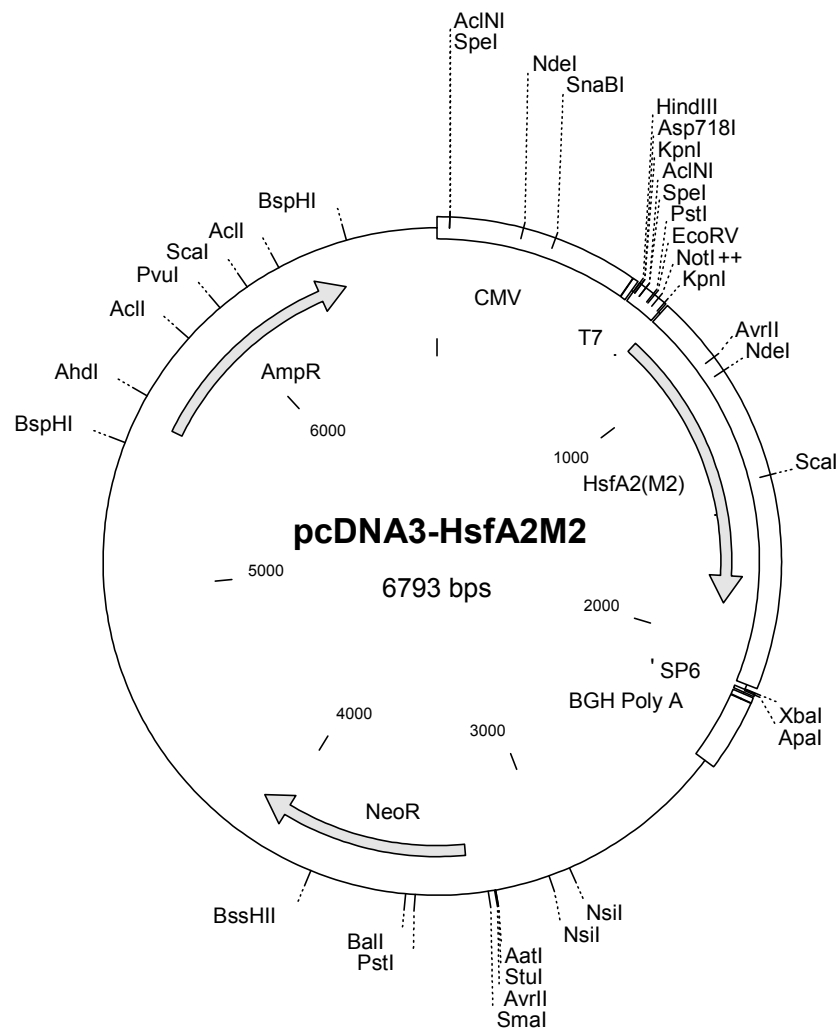
Insert:		Lp-HsfA2				No.:	DH78
Cloning Vector:		pDsRed-N1 (Clontech)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Neo <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				HsfA2 (aa1-351)xDsRed fusion protein		
Used for:		Expression of C-terminally DsRed-tagged Lp-HsfA2(aa1-351) in mammalian cells					
Remarks:		PCR amplification of HsfA2 from pRTHsfA2 with Pr.270F and Pr.654R (Apal); cloning of XhoI/Apal cassette into pDsRed-N1 vector (Clontech) XhoI/Apal					
Constructed by/obtained from:				C. Weber		Date:	02/01
Reference:		Labjournal D. Heerklotz/C. Weber			Sequencing:		ok



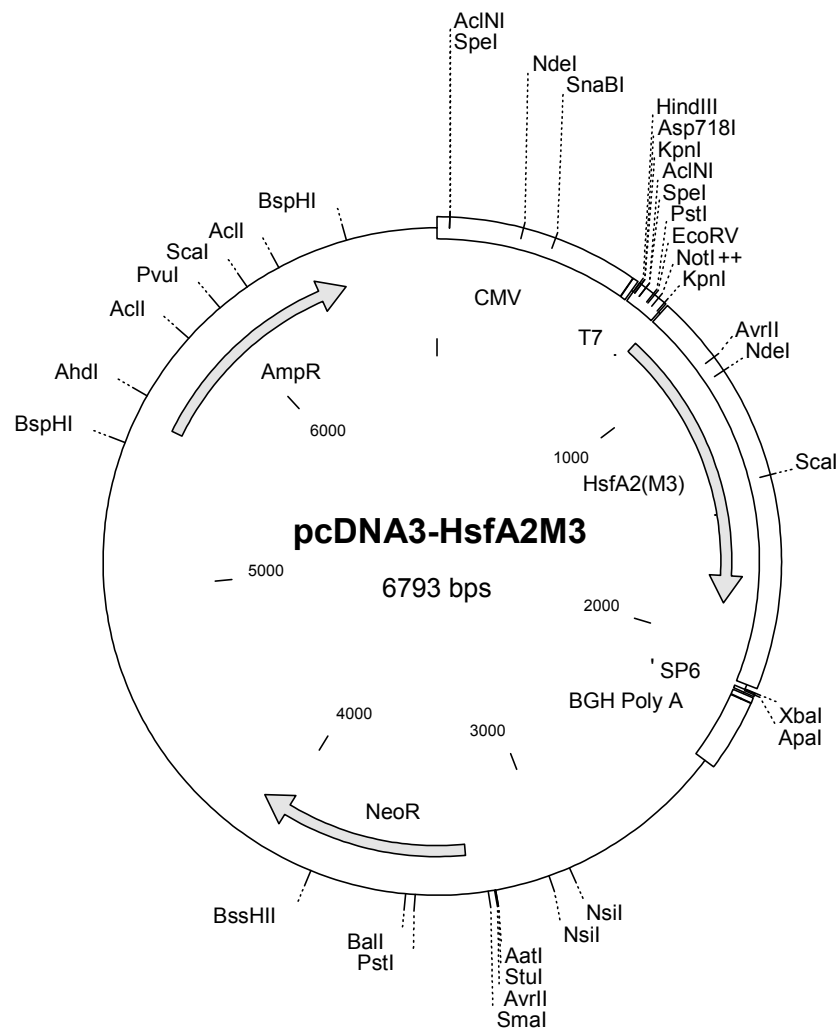


Insert:		Lp-HsfA2			No.:		DH78	
Cloning Vector:		pECFP-N1 (Clontech)						
Host Organisms:					Functional Markers:			
1.	E. coli					Neo <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells					HsfA2 (aa1-351)xCFP fusion protein		
Used for:		Expression of C-terminally GFP-tagged Lp-HsfA2(aa1-351) in mammalian cells						
Remarks:		PCR amplification of HsfA2 from pRTHsfA2 with Pr.270F and Pr.654R (Apal); cloning of XhoI/Apal cassette into pECFP-N1 vector (Clontech) XhoI/Apal						
Constructed by/obtained from:			C. Weber			Date:		02/01
Reference:		Labjournal D. Heerklotz/C. Weber			Sequencing:		ok	

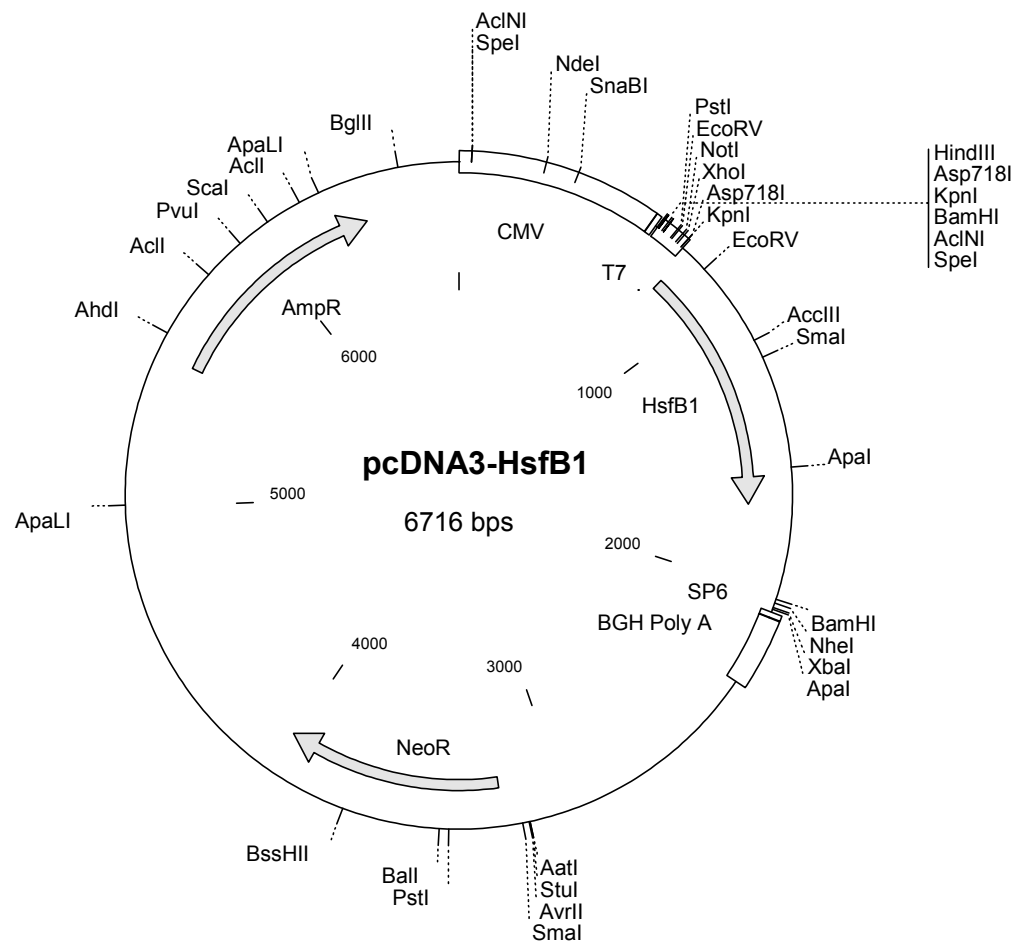




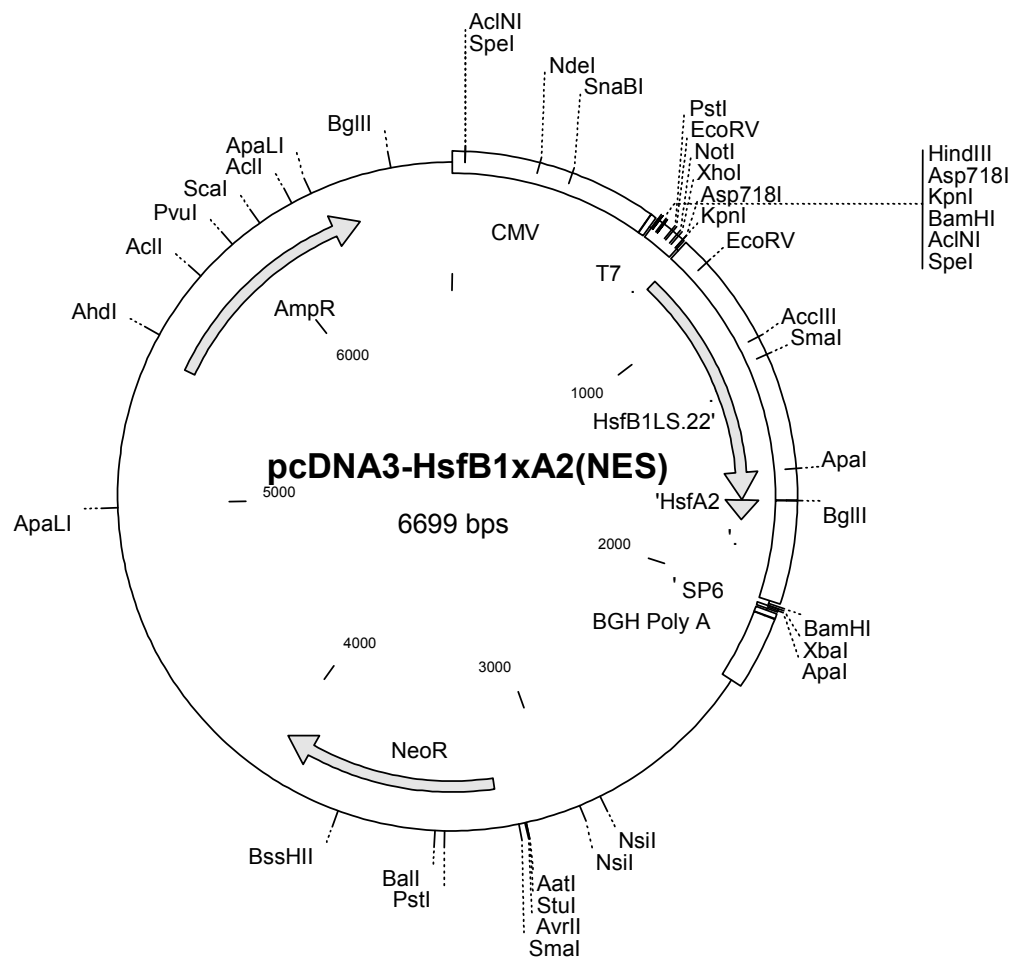
Insert:	Lp-HsfA2M2				No.:	DH15
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)					
Host Organisms:				Functional Markers:		
1.	E. coli			Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells			Lp-HsfA2M2 (aa1-351; KRR119-121>QST)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA2M2 (aa1-351; KRR119-121>QST) in mammalian cells				
Remarks:		subcloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA2M2 (RL107) into pcDNA3 XhoI/XbaI				
Constructed by/obtained from:			D. Heerklotz		Date:	06/99
Reference:	Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:		ok



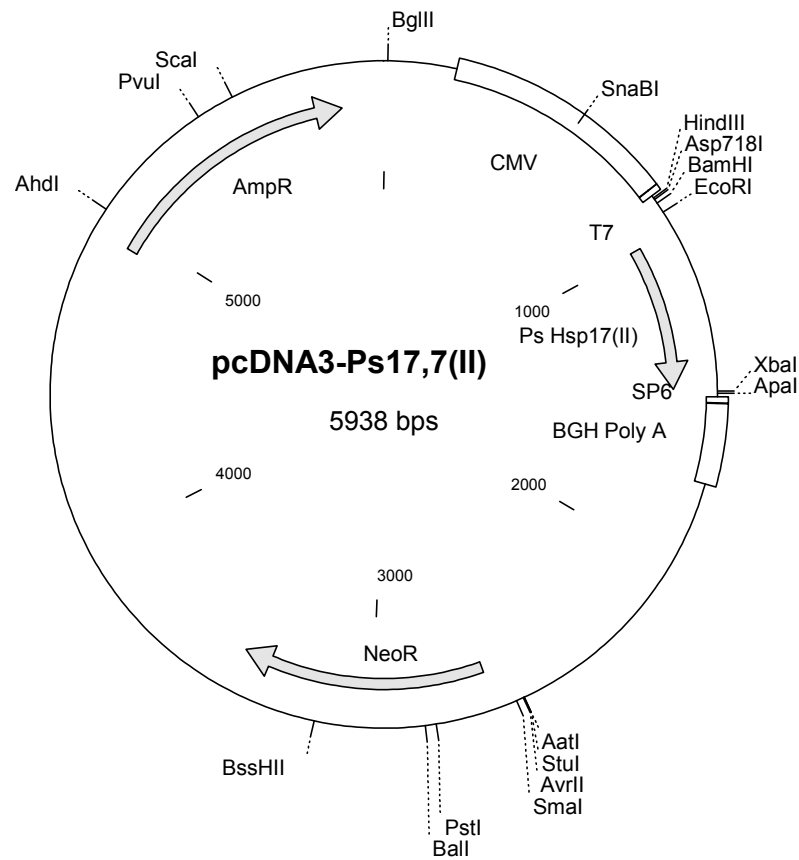
Insert:		Lp-HsfA2M3				No.:	DH16
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Lp-HsfA2M3 (aa1-351; KRR228-230>QST)		
Used for:		Expression of Lp-HsfA2M3 (aa1-351; KRR228-230>QST) in mammalian cells					
Remarks:		subcloning of XhoI/XbaI fragment from pRTHsfA2M3 (RL108) into pcDNA3 XhoI/XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	06/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



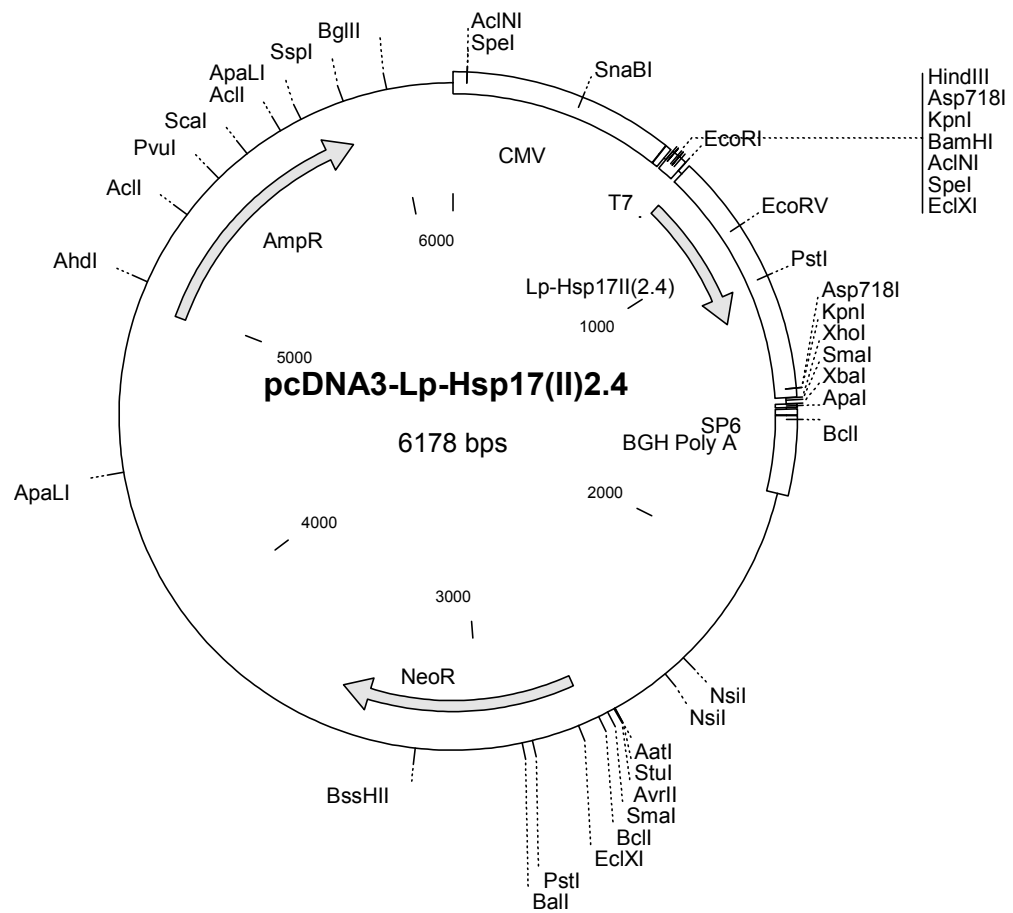
Insert:		Lp-HsfB1				No.:	DH04
Cloning Vector:		pcDNA3 (Invitrogen)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Lp-HsfB1 (aa1-301)		
Used for:		Expression of Lp-HsfB1 (aa1-301) in mammalian cells					
Remarks:		Subcloning of XhoI/XbaI fragment from pBSE24LS into pcDNA3 XhoI/XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	06/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



Insert:	Lp-HsfB1.22xA2(NES)			No.:	DH46
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells		Lp-HsfB1.22xA2.BglII (NES)		
Used for:	Expression of Lp-HsfB1xA2.BglII (NES) fusion protein in animal cells				
Remarks:	Subcloning of XhoI/XbaI fragment from pRTB1.22,aa1-294,DLxA2(NES), aa331-351 (PD183) into pcDNA3;				
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz		Date:	02/99
Reference:	Heerklotz et al., 2001			Sequencing:	ok

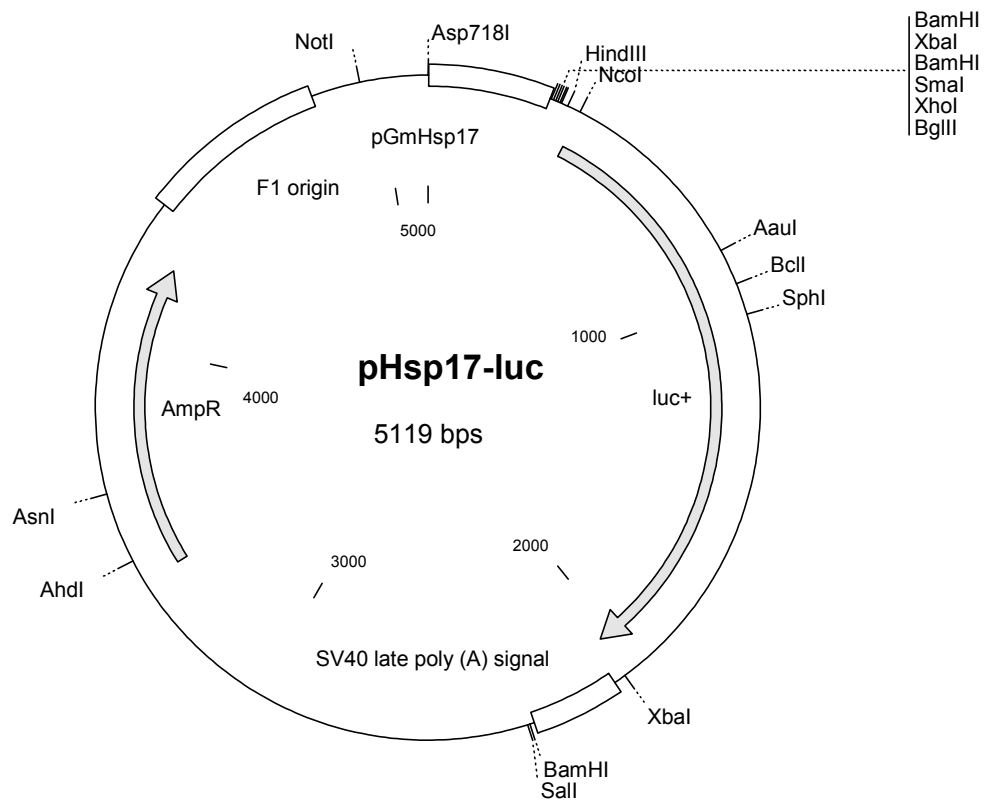


Insert:	Ps-Hsp17,7 Class II				No.:	DH12	
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)						
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Ps-Hsp17,7(II) (aa1-152)		
Used for:		Expression of pea Hsp17,7(II) (aa1-152) in animal cells					
Remarks:		Subcloning of EcoRI/XbaI fragment from pRT-Ps-Hsp17II (MK2) into pcDNA3 EcoRI/XbaI					
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz		Date:	03/99
Reference:		Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:		ok

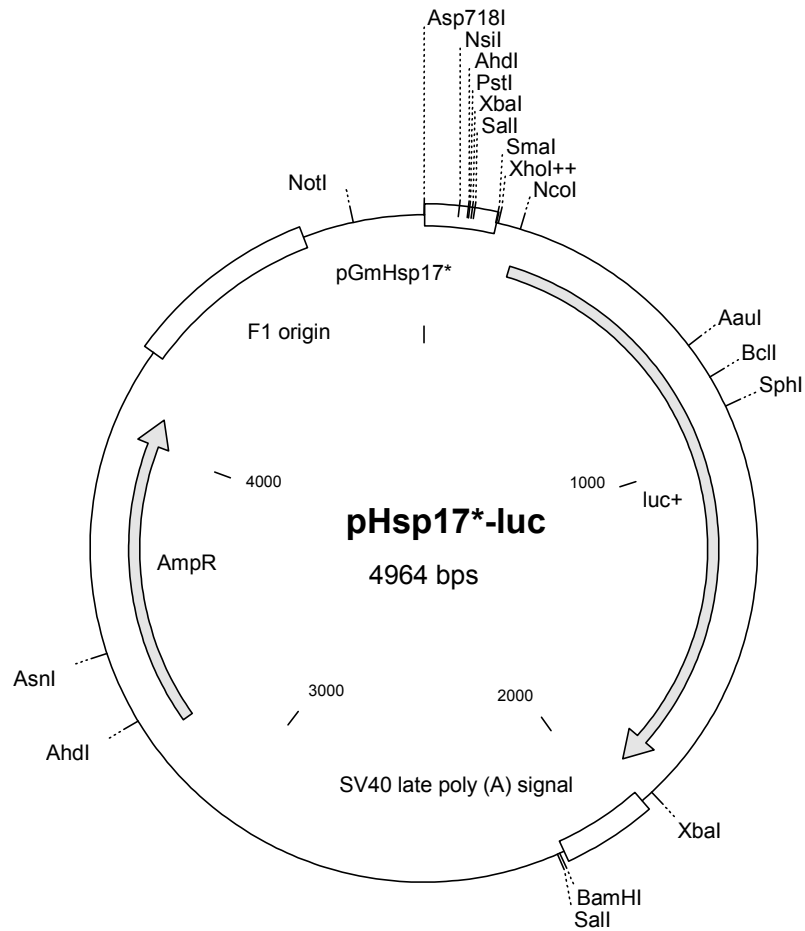


Insert:	Lp-Hsp17 Class(II)2.4			No.:	DH13
Cloning Vector:	pcDNA3 (Invitrogen)				
Host Organisms:				Functional Markers:	
1.	E. coli		Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells		Lp-Hsp17,7(II)2.4 (aa1-155)		
Used for:	Expression of tomato Hsp17(II)2.4 (aa1-155) in animal cells				
Remarks:	Subcloning of EcoRI/XbaI fragment from pRT-Lp-Hsp17(II)2.4 into pcDNA3 EcoRI/XbaI				
Constructed by/obtained from:		D. Heerklotz		Date:	03/99
Reference:	Labjournal D. Heerklotz			Sequencing:	ok





Insert:		Gm-Hsp17.3 Promoter				No.:	DH71:
Cloning Vector:		pGL3-basic (Promega)					
Host Organisms:					Functional Markers:		
1.	E. coli				Amp <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells				Gm-Hsp17.3 Promoter		
Used for:		Expression of luciferase reporter in animal cells					
Remarks:		PCR amplification of Gm-Hsp17.3 in pHsp17gus with Pr.587F (Asp718I) and Pr.285R; cloning of Asp718I/SmaI cassette into pGL3 (Promega) Asp718I/SmaI					
Constructed by/obtained from:			D. Heerklotz			Date:	08/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok



Insert:		Gm-Hsp17.3* Promoter					No.:	DH73
Cloning Vector:		pGL3-basic (Promega)						
Host Organisms:					Functional Markers:			
1.	E. coli					Amp <sup>r</sup>		
2.	Mammalian cells					Gm-Hsp17.3* Promoter		
Used for:		Expression of luciferase reporter in animal cells						
Remarks:		PCR amplification of Gm-Hsp17.3 in pHsp17gus* with Pr.585F (Asp718I) and Pr.586R (SmaI); cloning of Asp718I/SmaI cassette into pGL3 (Promega) Asp718I/SmaI						
Constructed by/obtained from:				D. Heerklotz			Date:	08/99
Reference:		Heerklotz et al., 2001			Sequencing:		ok	

## 7 Zusammenfassung

Hitzestress führt bei allen bisher untersuchten Organismen zu einer transienten Umprogrammierung des Transkriptions- und Translationsapparats. Bei diesem auch als Hitzestressantwort bezeichneten Prozess wird vorrangig eine neue Klasse von Proteinen exprimiert, die als Hitzestressproteine (Hsp) bezeichnet werden. Eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktionskette der Hitzestressantwort spielen Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf). Hsf sind hochkonservierte, modular aufgebaute Proteine mit einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne (DBD), einer zentralen Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region) und einer C-terminalen Aktivator-domäne (AD). Über ihre DBD sind oligomerisierte Hsf in der Lage an hochkonservierte Motive, sogenannte Hitzestresselemente (HSE), in der Promotorregion von Hsp zu binden und deren Transkription zu initiieren.

In hitzestressierten Zellen von *Lycopersicon peruvianum* (Perutomate) können neben den konstitutiv exprimierten Hitzestresstranskriptionsfaktoren A1 und A3 die beiden stressinduzierten Vertreter HsfA2 und B1 nachgewiesen werden.

In präinduzierten Zellen befindet sich HsfA2 trotz einer funktionellen Kernimportsequenz (NLS) überwiegend im Zytoplasma. Dieses Verhalten von HsfA2 wurde bisher durch eine konformationsbedingte Maskierung der NLS erklärt. Der Kotransport von HsfA2 in den Zellkern erfolgt in diesem Modell durch eine heterologe Interaktion mit HsfA1.

Mit dem Ziel, die für den Transport und die Interaktion mit HsfA1 verantwortlichen Strukturelemente von HsfA2 näher zu untersuchen, wurden verschiedene Tomaten-Hsf sowohl in Tabakprotoplasten, als auch in CHO-K1 Zellen heterolog exprimiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich HsfA2 auch ohne die Interaktion mit HsfA1 im Zellkern anreicherte, wenn der Kernexportrezeptor Crm-1 mit dem Antibiotikum Leptomycin B (LMB) inhibiert wurde. HsfA2 wird demnach permanent zwischen Kern und Zytoplasma hin- und hertransportiert, wobei der Kernexportprozess dominiert. Die für den Export verantwortliche, leucinreiche Kernexportsequenz (NES) konnte am äussersten C-Terminus von HsfA2 identifiziert werden. HsfA2-Mutanten, bei denen dieser Sequenzabschnitt deletiert bzw. die Leucine durch Alanine substituiert wurden, waren überwiegend im Zellkern lokalisiert. Die Fusion der

NES von HsfA2 an den ausschliesslich im Zellkern lokalisierten HsfB1 führte zum Export des Fusionsproteins ins Zytoplasma, was durch die Zugabe von LMB wieder umgekehrt wurde. Ferner konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion mit HsfA1 und den Kotransport in den Zellkern die HR-A/B Region essentiell ist.

Mit Hilfe eines Luciferasereporterassays konnte der Zusammenhang zwischen der Lokalisation von HsfA2 und dessen Transaktivierungspotential in CHO-K1 Zellen demonstriert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die im Zellkern lokalisierte NES-Mutante eine ca. 20-fach höhere Aktivität im Vergleich zum zytoplasmatisch lokalisierten Wildtyp hatte. Ebenso führte die LMB-bedingte Anreicherung von HsfA2 im Zellkern bereits nach 6 h zu einer messbaren Steigerung der Aktivität. Eine synergistische Aktivitätszunahme konnte, wie auch schon in Tabakprotoplasten beobachtet, bei gleichzeitiger Expression mit HsfA1 gemessen werden.

In Hitzestressversuchen (41 °C) konnte gezeigt werden, dass HsfA2 in CHO-K1 Zellen selbst unter dem Einfluss von LMB nicht mehr in den Zellkern importiert wurde. Bei Zellen, die sich unter LMB-Einfluss bei 37°C von dem Hitzestress erholten, kam es jedoch bereits nach 15 min zu einer sichtbaren Translokation von HsfA2 in den Zellkern. Dieses Verhalten lässt Rückschlüsse auf eine mögliche, konformationsbedingte Maskierung der NLS unter Hitzestress zu. Insbesondere da die HsfA2-Mutante, bei der die HR-A/B-Region fehlte, sich auch unter Hitzestress im Zellkern anreicherte.

Neben der löslichen Form im Zytoplasma kommt HsfA2 in Tomatenzellen unter Hitzestress auch in einer unlöslichen, strukturgebundenen Form vor. Diese als Hitzestressgranula (HSG) bezeichneten Komplexe bestehen überwiegend aus niedermolekularen (lmw)-Hsp. Es konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von lmw-Hsp und HsfA2 unabhängig vom Expressionssystem zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate führte, in denen beide Proteine nachweisbar waren. Hierbei konnte sowohl eine klassen- als auch eine artspezifische Interaktion von HsfA2 mit Klasse II lmw-Hsp aus Tomate beobachtet werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die HR-A/B Region für die Interaktion von HsA2 mit lmw-Hsp essentiell ist.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. Lutz Nover für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes bedanken. Ferner bin ich dankbar für viele aufmunternde Worte und konstruktive Kritiken, die zum Abschluss der Arbeit geführt haben. Insbesondere danken möchte ich Marc Kirschner und Sybille Winkelhaus für eine gute Zusammenarbeit im Labor und zahlreiche Ratschläge. Ein weiteres grosses Dankeschön geht an Claudia Tietjen, die mir 3 Jahre als Technische Assistentin praktisch zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei allen Praktikanten bedanken, die durch ihre Mithilfe zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ein weiteres Dankeschön geht an alle Kollegen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben insbesondere unsere Technischen Assistentinnen.

Privat möchte ich meiner Familie für die Unterstützung vor und während der Doktorarbeit danken. Das letzte riesengrosse Dankeschön geht an meine Frau Petra, die mir nicht nur bei der Durchsicht der Arbeit geholfen hat, sondern auch immer an meiner Seite stand.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den 09.Juli 2001

# Lebenslauf

Name: Dirk Heerklotz  
Anschrift: Bergstrasse 72  
CH-8706 Meilen  
Geburtsdatum: 16.06.1969  
Geburtsort: Wiesbaden, Deutschland  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Alter: 32 Jahre

## Schulische Ausbildung:

1976 – 1980 Besuch der Riederberg-Grundschule in Wiesbaden  
1980 – 1981 Besuch des Rhein-Main Gymnasiums in Wiesbaden  
1981 – 1989 Besuch des Humboldt Gymnasiums in Wiesbaden  
Abschluss: Abitur

## Universitäre Ausbildung:

1989 – 1990 Bauingenieurstudium an der Technischen Hochschule Darmstadt  
1990 – 1996 Biologiestudium an der Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Hauptfächer: Botanik, Zoologie  
Nebenfach: Umweltrecht  
Abschluss: Diplom  
1997 – 2001 Promotionsarbeit im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie der  
Goethe-Universität Frankfurt am Main

## Publikationen:

Bharti K, Schmidt E, Lyck R, Heerklotz D, Bublak D, and Scharf K-D (2000) Isolation and characterization of HsfA3 a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. The Plant J. **22** 355-366

Heerklotz D, Döring P, Bonzelius F, Winkelhaus S, and Nover L (2000) The balance of nuclear import and export decides on the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. Mol. Cell. Biol. **21** 1759-1768